

**Untersuchungen zur Transkription von
knochenpathogenen Retroviren
in Skelettzellkulturen**

Anselm Berthold

Disbui. München

1989



Aus der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH
München
Abteilung für Molekulare Zellpathologie
Leiter: Prof. Dr. Volker Erfle
vorgelegt über das

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und
Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr

**Untersuchungen zur Transkription von
knochenpathogenen Retroviren
in Skelettzellkulturen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der
Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Anselm Berthold
aus
Mainz

München 1989

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse
Referent:	Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. C. Knospe

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

Inhaltsverzeichnis

Seite

A.	Einleitung.....	3
B.	Schrifttum.....	4
C	Material und Methoden.....	9
C.I.	Material.....	9
C.I.1.	Säugerzellen.....	9
C.I.2.	Bakterien.....	9
C.I.3.	Plasmide.....	9
C.II.	Zellbiologische Techniken.....	11
C.II.1.	Zellkulturen.....	11
C.II.2.	Einfrieren von Säugerzellen.....	11
C.II.3.	Transfektion von Säugerzellen.....	12
C.II.3.1.	Transiente Transfektion.....	12
C.II.3.2.	Stabile Transfektion.....	13
C.II.3.3.	Stabil transfizierte Zellkulturen im Experiment.....	14
C.III.	Molekularbiologische Techniken.....	15
C.III.1.	Bakterienkulturen.....	15
C.III.1.1.	Bakterienkulturen auf Agarplatten.....	15
C.III.1.2.	Anlegen von Dauerkulturen.....	15
C.III.2.	Transformation von E. coli Zellen.....	15
C.III.3.	Isolierung von DNS.....	16
C.III.3.1.	Schnellpräparation von Plasmid DNS.....	16
C.III.3.2.	Präparation von supercoiled Plasmid DNS.....	17
C.III.3.3.	Präparation von zellulärer DNS und RNS.....	19
C.III.4.	DNS-Analysen.....	20
C.III.4.1.	DNS-Konzentrationsbestimmung.....	20
C.III.4.2.	Agarosegel-Elektrophorese.....	21
C.III.4.3.	Restriktionsenzym-Analyse.....	21
C.III.4.4.	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	22
C.III.4.5.	^{32}P -Markierung von DNS-Fragmenten (Multiprime-Reaktion).....	22

C.III.4.6.	DNS-Transfer auf Nitrozellulose-Membranen (Southern-Blotting).....
C.III.4.7.	Southern Blot Hybridisierung.....
C.III.5.	RNS-Analysen.....
C.III.5.1.	RNS-Konzentrationsbestimmung.....
C.III.5.2.	RNS Agarosegel-Elektrophorese.....
C.III.5.3.	RNS Transfer auf Zetaprobe Membranen (Northern Blotting).....
C.III.5.4.	Northern Blot Hybridisierung.....
C.IV.	Enzymnachweise.....
C.IV.1.	Gewinnung von Zellextrakten und Protein- bestimmung.....
C.IV.2.	Nachweis der Chloramphenicol-Azetytransferase (CAT-Assay).....
C.IV.2.1.	CAT-Assay mittels Dünnschichtchromatographie.....
C.IV.2.2.	CAT-Assay im Flüssigkeitsszintillationszähler.....
C.IV.3.	Nachweis der Alkalischen Phosphatase.....
D.	Ergebnisse.....
D.I.	Knochenzelldifferenzierung und LTR-Aktivität knochenpathogener Retroviren.....
D.I.1.	Etablierung differenzierungsmodulierender Substanzen.....
D.I.2.	Etablierung stabil transfizierter Zellen.....
D.I.2.1.	Stabile Transfektion osteogener Zellen mit rekombinanten Plasmidvektoren.....
D.I.2.2.	Nachweis der Integration der Vektoren.....
D.I.2.3.	Nachweis der Expression des CAT Gens.....
D.I.3.	Knochenzelldifferenzierung und LTR Aktivität.....
D.I.3.1.	Spontane osteogene Differenzierung und LTR- Aktivität.....
D.I.3.2.	Induzierte osteogene Differenzierung und LTR- Aktivität.....
D.II.	Einfluß von Hormonen auf die LTR Aktivität.....
D.III.	Einfluß des c-fos Onkogens auf die Transkription knochenpathogener Retroviren.....

E	Diskussion.....	54
F	Zusammenfassung.....	64
G	Literaturverzeichnis.....	66



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Abkürzungen

Akv MuLV	endogenes Retrovirus der AKR Maus
ALP	Alkalische Phosphatase, Differenzierungsmarker für Knochengewebe
amp	bakterielles Gen, das die Ampizillinresistenz vermittelt
c-fos	zelluläres Homolog des viralen fos Onkogens
CAP	Chloramphenicol, Antibiotikum
CAT	bakterielles Resistenzgen, kodiert für Chloramphenicol-Azetyltransferase, Verwendung als Reportergen
CBB	Coomassie Brilliant Blau, Nachweisreagens für Proteine
Ci	Curie, Maß für die Anzahl der radioaktiven Zerfälle (1 Ci=3,7x10 ¹⁰ Bq)
cpm	"counts per minute", Zählimpulse pro Minute
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DEAE	Diethylaminoethan, Ionenaustauscher, bindet DNS
DEPC	Diethyl-Pyrokarbonat, zerstört RNS-abbauende Enzyme
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid, permeabilisiert biologische Membranen
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukletotide ("Basen"), Bausteine der DNS
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure, Chelatbildner
env	"envelope", retrovirales Strukturprotein
FBJ MuSV	von Finkel, Biskis und Jinkins isoliertes MuSV
FBR MuSV	von Finkel, Biskis und Reilly isoliertes MuSV
FKS	Fötale Kälberserum
gag	"Gruppenspezifisches Antigen", retrovirales Strukturprotein
GRE	"Glucocorticoid responsive element"
HEPES	N-2 Hydroxyethylpiperazin -N'-2-ethansulfonsäure, Puffer für Zellkulturen
I.E.	Internationale Einheiten
ipm	Impulse pro Minute
jun/ AP 1	Gen für einen DNS-bindenden Transkriptionsfaktor
LB	"Luria-broth", Bakteriellenkultur-Medium

LTR	"long terminal repeat", Regulationseinheit von Retroviren
Mo MuLV	Moloney MuLV
MuLV	Murines Leukämievirus
MuSV	Murines Sarkomvirus
neo	bakterielles Gen, das die Neomycinresistenz vermittelt
OA MuLV	aus Osteom (engl. "osteoma") isoliertes MuLV
PBS	"phosphate buffered saline", Puffer für Zellkulturen
pol	"Polymerase", retrovirales Strukturprotein
RFB MuLV	von Reilly, Finkel und Biskis isoliertes MuLV
RNS	Ribonukleinsäure
ROS 17/2.8	Aus Ratten-Osteosarkom isolierte Zelllinie
SDS	"Sodium-Dodecyl-Sulphate", denaturiert Proteine
SSC	"Sodiumchloride-Sodiumcitrate", Salzlösung für Nukleinsäuretransfer ("Blot")
SV2	Promotorregion des SV 40 Virus ("simian virus 40")
TE	Tris-EDTA, Puffer für Nukleinsäuren
TGF- β	"transforming growth factor β ", Wachstumsfaktor
U3	"unique 3'", Region in der retroviralen LTR
Upm	Umdrehungen pro Minute
v-fos	virales fos Onkogen

A. Einleitung

Die Entstehung von Tumoren im Knochengewebe nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen ist vom Auftreten retroviraler C-Typ Partikel begleitet. Die Grundlage dafür ist die Aktivierung von endogenen Retroviren oder sogenannten Proviren. Diese Partikel sind infektiös und können selbst wieder Knochentumoren verursachen. Ein Modell zur Knochentumorentstehung basiert auf der Vorstellung, daß eine Aktivierung von Proviren bei der Tumorentstehung ursächlich beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, unter welchen Bedingungen im Knochengewebe eine Aktivierung der Transkription dieser Viren stattfindet.

B. Schrifttum

Retroviren werden für eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheiten bei Mensch und Tier verantwortlich gemacht. Das Spektrum reicht von der Immunsuppression (Human Immunodeficiency Virus, HIV) über neurologische Störungen (Mædi Visna Virus, MVV) zu Tumoren verschiedener Gewebe, wie der Leukozyten (Bovines Leukämie Virus, BLV), des Brustgewebes (Mouse Mammary Tumour Virus, MMTV) und des Bindegewebes (Rous Sarkom Virus, RSV). Bei diesen Viren handelt es sich um exogene Retroviren. Sie werden durch Infektion übertragen. Als endogene Retroviren werden solche bezeichnet, die fester Bestandteil der chromosomalen DNS sind und nach den Mendelschen Regeln über die Keimbahn weitergegeben werden.

Retroviren besitzen ein RNS-Genom, das im Viruspartikel in doppelter Ausfertigung vorliegt. Es enthält die Information für die drei Gene *gag*, *pol* und *env*, sowie für die Regulationseinheiten, die "long terminal repeats" (LTRs). Das *gag* Gen ("gruppenpezifisches Antigen") kodiert für die Strukturproteine des Virion. Das *pol* Gen ("Polymerase") kodiert für das einzigartige Enzym Reverse Transkriptase, welches die genomische RNS-Information in DNS umschreibt (reverse Transkription), sowie die Integration dieses Produkts in Wirtszell DNS vermittelt. Das *env* Gen ("envelope") kodiert für die Hüllproteine der Viruspartikel. Diese Einheiten sind im RNS-Genom folgendermaßen angeordnet: Auf die Sequenzen R ("repeat") und U5 ("unique 5'") folgen *gag*, *pol* und *env*, daraufhin U3 ("unique 3'") und wieder R.

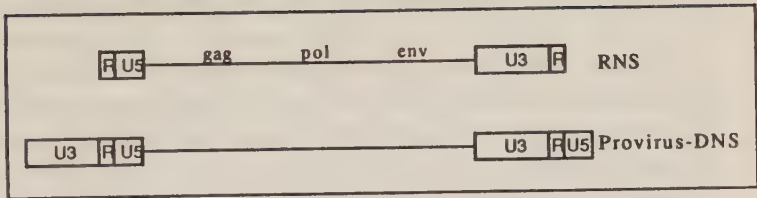


Abb.1: Die Genomstruktur von Retroviren.

Die Reverse Transkriptase erzeugt nach dem Muster der RNS über das Zwischenprodukt eines DNS-RNS Hybrids ein doppelsträngiges DNS Molekül, welches in die Wirtszell DNS integriert werden kann. In der integrierten ("proviralen") Form sind die Gene gag, pol und env beiderseits durch U3, R und U5 flankiert. Diese Anordnung U3-R-U5 wird als LTR bezeichnet (Abb.1).

Die Funktion der U3 Region liegt in der Kontrolle der Transkription des proviralen Genoms durch das zelluläre Enzym RNS Polymerase II. Die R Regionen an beiden Enden des Genoms sind für die reverse Transkription notwendig. Eine Funktion der U5 Region ist noch nicht bekannt.

Es ist bisher noch nicht geklärt, welche dieser Elemente für die Pathogenität von Retroviren verantwortlich sind, es gibt jedoch verschiedene Hinweise: Ein Spaltprodukt des env-Proteins, das p15E, besitzt die Fähigkeit zur Immunsuppression (Snyderman und Gianciolo 1984), die der Tumorentstehung oft vorausgeht (Cerny und Essex 1978). Bei dem stark leukämogenen Gross A Virus ist das gp70^{env} Protein für die Entfaltung der vollen Virulenz nötig (DesGrosseillers und Jolicœur 1984). Die LTRs bestimmen die Gewebespezifität sowie die Virulenz der Viren, wie durch Rekombinationsexperimente zwischen Retroviren

unterschiedlicher Zellspezifität (Chatis et al., 1983) bzw. unterschiedlicher Virulenz (Lenz et al., 1984) gezeigt wurde.

Den LTRs kommt offensichtlich eine besondere Bedeutung zu. Ihre Funktion besteht in der Kontrolle der Transkription des viralen Genoms. In der U3 Region der LTR liegt der **Transkriptionsstart**. Etwa 35 Basenpaare weiter 5' (d.h. relativ zur Transkriptionsrichtung "stromaufwärts") befindet sich der **Promotor**, der für die Bindung der RNS Polymerase II benötigt wird. Weiter 5' liegt die **Enhancer Region**, die verschiedene Proteinbindungsstellen enthält. Hier erfolgt durch eine Bindung korrespondierender "DNS-bindender Proteine" eine Aktivierung (oder Repression) der Transkriptionsrate. Diese DNS-bindenden Proteine sind also, vorausgesetzt die Bindungsstellen sind auf der viralen DNS vorhanden, die eigentlichen Regulatoren der Transkriptionsrate.

Das hinsichtlich der molekularen Organisation bisher am besten untersuchte Retrovirus ist das AIDS Virus HIV. In der HIV-LTR wurden bisher 8 verschiedene Proteinbindungsstellen identifiziert, an die zelluläre Proteine binden (Shaw et al., 1988, Ratner und Niederman, 1988; Kaufmann et al., 1987; Jones et al., 1986 und 1988; Garcia et al., 1987). Darüber hinaus binden die von HIV kodierten Proteine tat und rev an die Sequenzen TAR bzw. CAR (Rosen et al., 1985 und 1988), und ein weiteres virales Regulatorprotein, nef, nimmt über zelluläre Botenstoffe Einfluß auf die Sequenz NRE (Ahmad et al., 1988). Ebenso wurden im LTR des Moloney murinen Leukämievirus (MoMuLV) 6 verschiedene Proteinbindungsstellen identifiziert (Speck und Baltimore, 1987).

Die Ausstattung der Wirtszellen mit DNS-bindenden Proteinen ist entscheidend für die Virustranskription: Verschiedene Zelltypen exprimieren unterschiedliche DNS-bindende Proteine. Dies hat zur Folge, daß die Virustranskription in Abhängigkeit

vom Wirtszelltyp variiert (Celandier und Haseltine 1984). Auch der Differenzierungszustand einer Zelle beeinflusst aufgrund der Veränderung des Proteinmusters die Virustranskription: Für das Moloney murine Leukämievirus (MoMuLV) besteht in undifferenzierten Zellen ein Block, der auf die Bindung eines Proteins an eine Region im viralen Enhancer zurückzuführen ist (Grez et al., 1988). In undifferenzierten Zellen ist dieser Block nicht vorhanden und MoMuLV wird exprimiert. Auch in verschiedenen Retrovirus-verwandten Sequenzen findet sich eine vom Differenzierungszustand abhängige Transkription (Parkhurst und Corces 1987; Brulet et al., 1983).

Eine weitere Klasse von DNS-bindenden Proteinen bilden die Hormonrezeptoren, die nach ihrer Aktivierung durch das Hormon an entsprechende DNS-Sequenzen binden und die Transkription regulieren (Yamamoto, 1985). Dies konnte unter anderem für das Glukokortikoidhormon, Östrogen und das Schilddrüsenhormon T3 gezeigt werden (Geisse et al., 1982; Klein-Hitpass et al., 1986; Glass et al., 1988). Das MMTV kann aufgrund eines "glucocorticoid response element" (GRE) durch Glukokortikoide sehr stark induziert werden (Yamamoto, 1985).

Auch unter den Onkogenen gibt es eine Gruppe, die ihre Wirkung durch Bindung an DNS-Regulationseinheiten entfalten. Dazu gehört u.a. das fos Onkogen. Das Fos Protein bindet im Komplex mit Jun/AP-1 an bestimmte DNS Sequenzen (Sassone-Corsi et al., 1988; Chiu et al., 1988). Es reguliert die Transkription verschiedener zellulärer (Distel et al., 1987, Sassone-Corsi et al., 1988) sowie retroviraler Gene (Franza et al., 1988). Das v-fos Onkogen ist Bestandteil vom FBR- und vom FBJ-Murinen Sarkomvirus (MuSV). Vermutlich ist die unphysiologische fos-Expression am Entstehen von Knochentumoren beteiligt, denn bei c-fos transgenen Mäusen

treten maligne Knochenveränderungen auf (Rüther et al., 1987; Rüther et al., Manuskript eingereicht).

Verschiedene endogene Retroviren induzieren nach der Infektion neugeborener Mäuse benigner Knochenveränderungen wie Osteome und Osteopetrose, sowie Lymphome (Schmidt et al., 1984). Bei gleichem Pathogenitätsspektrum unterscheiden sich die Isolate Akv-MuLV (Lowy et al., 1980), OA-MuLV (Leib-Mösch et al., 1986) und RFB MuLV (Finkel et al., 1973) in ihrer Virulenz : Das RFB MuLV ist am virulentesten, Akv-MuLV am schwächsten. Die Enhancerregionen dieser Viren sind aus identischen Elementen aufgebaut, die unterschiedlich arrangiert sind. Diese Elemente enthalten "enhancer core Sequenzen", GREs und weitere Proteinbindungsstellen, die auch in der Enhancer Region von MoMuLV vorkommen (Speck und Baltimore 1987). In einer differenzierten Knochenzelllinie ist die LTR Aktivität dieser knochenpathogenen MuLVs höher als in einer undifferenzierten (Behnisch 1988).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welcher Weise die Transkription der knochenpathogenen Retroviren Akv-MuLV, OA-MuLV und RFB MuLV a) durch den Differenzierungsgrad von Knochenzellen, b) durch die Einwirkung von Hormonen oder c) durch die Einwirkung des fos Onkogens beeinflußt wird.

C. Material und Methoden

C.I. Material

C.I.1. Säugerzellen

Die Zelllinie ROS 17/2.8 stammt von Gideon Rodan, Merck, Sharpe & Dohme, Westpoint Pa., USA.. Diese Zelllinie wurde aus einem Osteosarkom einer Ratte isoliert (Majeska et al., 1980). Die Zellen sind in der Lage, in vitro zu differenzieren, sie zeigen verschiedene osteoblastentypische Marker, wie z.B. die Expression der Alkalischen Phosphatase (Noda und Rodan, 1987). Die spontane Differenzierung im Laufe der Zellkultur kann durch Zugabe von TGF- β gesteigert, durch Retinolsäure verhindert werden.

C.I.2. Bakterien

Kompetente Bakterienzellen vom Stamm JM 83 (Vieira und Messing, 1982) wurden von Robert Baier aus der Arbeitsgruppe von Günter Strauss präpariert. Dieser E. coli Stamm dient zur Vermehrung von "pUC" Plasmiden (Vieira und Messing, 1982).

C.I.3. Plasmide

Die Plasmide pAkv CAT, pOA CAT und pRFB CAT (Behnisch, 1988) wurden mir von Werner Behnisch überlassen. Diese Plasmide enthalten die U3LTR Sequenzen von Akv MuLV, OA MuLV und RFB MuLV in Verbindung mit dem CAT Reportergen.

Die verwendeten Plasmide pSV2 CAT und pSV2 neo stammen von Martin Lipp, Institut für Biochemie der LMU München. Beide Plasmide enthalten die Promotor- und

Enhancersequenzen des SV40 Virus, bei pSV2CAT kontrollieren diese das CAT Reportergen, bei pSV2neo das Neomycin-Resistenzgen (Gorman et al., 1982).

Das Plasmid p76/21 stammt von Ulrich Rüther, EMBL Heidelberg. Es enthält die c-fos Sequenzen der Maus unter der Kontrolle des Metallothioninpromotors. 3' des c-fos Gens sind noch Sequenzen des FBJ-MuSV-3'LTRs eingefügt (Rüther et al., 1985).

Das Plasmid pMMTV CAT wurde von Pierre Chambon, Institut für Biochemie, INSERM, Straßburg, gestellt. Dem CAT Reportergen sind die Promotor- und Enhancersequenzen des MMTV LTR vorgeschaltet (persönliche Mitteilung).

C.II. Zellbiologische Techniken

C.II.1. Zellkulturen

Die einschichtig wachsenden Zellkulturen (Monolayer) wurden in Kulturflaschen von 25 bzw. 75 cm² (Falcon) und 150 cm² (Costar) Wachstumsfläche, sowie in Petrischalen von 2,5 und 5 cm Radius (Falcon) gezüchtet. Die Kulturgefäße wurden bei 37°C in einer 5%igen CO₂ Atmosphäre inkubiert. Als Nährlösung diente Dulbeccos Minimal Essential Medium (Gibco) mit einem Bikarbonatgehalt von 2,2 g/l, dem 10% fetales Kälberserum (FKS, Gibco), bzw. zur Anzucht nach dem Auftauen 20% FKS, zugesetzt wurden.

Die Passage der Zellen erfolgte, wenn die Zellen nahezu konfluent gewachsen waren. Dazu wurde die Zellkultur zweimal mit PBS ("phosphate buffered saline": 0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 8,1 mM NaH₂PO₄) gewaschen und anschließend mit Trypsinlösung (0,05% Trypsin; 0,02% EDTA) einige Minuten inkubiert, bis sich die Zellen voneinander und von ihrer Unterlage gelöst hatten. Dann wurden sie mit einer Verdünnung von 1:5 neu eingesät. Bei Verwendung im Experiment wurden die gewünschten Zelldichten nach Bestimmung der Zellzahl im automatischen Zellzähler (Coulter Counter Modell Z) eingestellt.

C.II.2. Einfrieren von Säugerzellen

1-2x10⁶ Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (20% FKS; 10% Dimethylsulfoxid, DMSO) eingefroren. Dabei wurde die Temperatur in einem Einfrierautomaten (MGW Lauda) mit 1°C/min auf -30°C gebracht. Eine kurzfristige Lagerung (Wochen bis Monate) war bei -70°C möglich, die langfristige Aufbewahrung (Monate bis Jahre) erfolgte in flüssigem Stickstoff.

C.II.3. Transfektion von Säugerzellen

C.II.3.1. Transiente Transfektion

Die Transfektion von Säugerzellen erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Gorman et al. (1982). Am Vortag der Transfektion wurden jeweils 1 bzw. 2×10^6 ROS 17/2.8 Zellen in Petrischalen von 100 mm Durchmesser (Falcon) eingesät.

Am Tag der Transfektion wurde zunächst das Medium gewechselt, dieses erhielt dabei zusätzlich Penicillin/Streptomycin (100 I.U. bzw. 100 µg/ml). Nach 4 Stunden Inkubation wurde ein Transfektions-Mix gleichmäßig auf den Zellen verteilt, der folgendermaßen hergestellt worden war:

In ein Eppendorf-Röhrchen wurden nacheinander pipettiert:

- 50 µl TE
- 3,75 µg Lachssperma-DNS (Boehringer Mannheim)
- 5 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNS
- 450 µl C-Mix (0,1x TE; 250 mM CaCl_2)

Ein zweites Röhrchen enthielt 500 µl $2 \times$ HBS (280 mM HEPES; 1,5 mM Na_2HPO_4 ; 280 mM NaCl). Dieses wurde auf einen Vortex Probenschüttler gehalten, und der Inhalt des ersten Röhrchens während genau 30 Sekunden tropfenweise einpipettiert. Bevor das sich dabei bildende Präzipitat auf den Zellen verteilt wurde, inkubierte es genau 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach vierstündiger Inkubation der Zellen bei 37°C wurde das Medium durch zweimaliges Waschen mit PBS vollständig entfernt. Dann wurde 1 ml Schock-Medium (20% DMSO in PBS) auf die Zellen gegeben und für genau 2 Minuten belassen. Das

Schock-Medium wurde durch zweimaliges Waschen entfernt, die Zellen wieder mit Antibiotika-haltigem Medium bei 37°C inkubiert.

C.II.3.2. Stabile Transfektion

Die stabile Transfektion von Zellen (Wigler et al., 1978) wurde dadurch erreicht, daß der selektierbare Marker der Neomycin-Resistenz kotransfiziert wurde. Dabei wurde prinzipiell wie bei der transienten Transfektion verfahren, jedoch abweichend davon wurde hier die Menge der zu transfizierenden DNS auf 15 µg erhöht. Die Lachs-Sperma DNS entfiel und 1 µg pSV2neo Plasmid-DNS wurde zugegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium durch frisches ersetzt, welches 400 µg/ml G 418 (Gibco) enthielt, weitere Mediumwechsel erfolgten zweimal wöchentlich bis zu dem Zeitpunkt, an dem die nicht abgestorbenen Zellen ausreichend dicht gewachsen waren, daß sie passagiert werden konnten.

Die erhaltenen Transfektanten konnten nun unter G418 Selektion als Zelllinien weitergeführt werden und bekamen die Bezeichnungen "17" für ROS 17/2.8, den Anfangsbuchstaben des Virus, dessen U3 LTR -bzw. Promotor- Region verwendet wurde (Akv MuLV, RFB Osteomavirus und OA MuLV, sowie MMTV und SV2 als Kontrollen), "C" für CAT und die Nummer des Ansatzes, also z.B. "17 AC3" im Falle des dritten Ansatzes des Akv LTR. Bei der stabilen Transfektion der Zellen mit dem fos-Plasmid bzw. pSV2neo wurden die Bezeichnungen 17-fos und 17-neo gewählt.

C.II.3.3. Stabil transfizierte Zellkulturen im Experiment

Für die Untersuchungen zur spontanen Differenzierung der stabil transfizierten ROS 17/2.8 Zellen wurden jeweils 200.000 Zellen im Vierfachansatz in Petrischalen von 2,5 cm Durchmesser eingesät. Das Kulturmedium enthielt 5% FKS; dieses wurde jeweils einen Tag vor der Ernte gewechselt.

Für die Untersuchungen zum Einfluß von Hormonen auf die LTR Aktivität wurde die gleiche Zellzahl eingesät, das Medium enthielt 10% FKS. Die Hormone wurden einen Tag nach der Einsaat zugegeben, die Ernte der Zellen erfolgte 24 h nach der Hormonbehandlung.

C.III. Molekularbiologische Techniken

C.III.1. Bakterienkulturen

C.III.1.1. Bakterienkulturen auf Agarplatten

LB-Agarplatten wurden aus Flüssig- oder Dauerkulturen oder aus Ausstrichen von Einzelklonen von anderen Agarplatten in Form von Ausstrichen beimpft. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden 10 g Trypton (Difco), 5 g NaCl und 5 g Hefeextrakt (Difco) in 1 l Wasser gelöst (= "Luria Broth", LB Medium, Maniatis et al., 1982). Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 wurden 15 g Agar (Difco) zugegeben, dann wurde die Lösung autoklaviert. Nachdem diese Lösung auf 52°C abgekühlt war, wurde gegebenenfalls Antibiotikum zugegeben (Ampizillin: 50 µg/ml) und jeweils ca. 35 ml in eine Petrischale gegossen.

C.III.1.2. Anlegen von Dauerkulturen

Von der Übernachtskultur wurde 1 ml in ein Glasgefäß gegeben, das bereits vorher mit 1 ml einer 50%igen Glycerinlösung befüllt und autoklaviert worden war. Die Bakterienkulturen wurden bei -70°C eingefroren und waren in dieser Form für Jahre haltbar.

C.III.2. Transformation von E. coli Zellen

100 µl kompetente E. coli Zellen Stamm JM 83 (Vieira und Messing, 1982; Präparation nach Morrison, 1979) wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 10 µl des zu transformierenden Plasmids (50 ng/ml Plasmidkonzentration) pipettiert. Es folgten

eine Inkubationsperiode von 20 Minuten im Eisbad und eine weitere von genau 2 Minuten im Wasserbad bei 42°C. Im Anschluß wurden 400 µl LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben, bevor die Suspension in ein 10 ml fassendes Reagenzglas transferiert und für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler (Lab Therm Lab Shaker, Fa. Adolf Kühner, Schweiz) inkubiert wurde. Schließlich wurde die Bakteriensuspension auf LB-Amp Platten (im Falle von Plasmiden, die die Ampizillinresistenz übertrugen) ausgestrichen. Dafür wurden in der Regel 3-5 Platten für Volumina zwischen 10 und 300 µl verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 18 h bei 37°C wurden jeweils die Platten zur Isolierung von Einzelkolonien ausgewählt, bei der die einzelnen Bakterienkolonien einen ausreichenden Abstand hatten.

C.III.3. Isolierung von DNS

C.III.3.1. Schnellpräparation von Plasmid DNS

Als einfache und schnelle Methode zur Präparation kleiner Mengen von Plasmid DNS erwies sich die Koch-Methode von Maniatis et al. (1982):

Eine 5 ml Bakterienkultur wurde 10 Minuten bei 6000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 700 µl Lysisbuffer (8% Sucrose; 0,5% Triton X-100, Sigma; 50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) in einem 1,5 ml Eppendorf Plastikgefäß suspendiert. Zu dieser Suspension wurden 50 µl Lysozymlösung (10 mg/ml, Sigma) gegeben. Das Plastikgefäß wurde dann für 90 Sekunden in ein kochendes Wasserbad gehalten und anschließend 20 Minuten lang bei 20°C mit 10000 Upm zentrifugiert. Das weiße Sediment wurde mit Hilfe eines sterilen Holzzahnstochers entnommen und verworfen.

Zur Denaturierung und Extraktion der noch im Überstand verbliebenen Proteine wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkhol (25:24:1), dazugegeben, kräftig durchgemischt, die Phasen durch zweiminütiges Zentrifugieren in einer Eppendorf Tischzentrifuge getrennt, und die DNS-haltige obere Phase in ein neues Gefäß überführt. Ebenso wurde mit Chloroform/Isoamylalkhol (24:1) und mit Ether extrahiert (dieser Vorgang wird später als "Phenolisieren" bezeichnet). Zur Fällung der DNS wurde der Lösung das gleiche Volumen Isopropanol zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 4°C mit 10000 Upm (HB-4 Rotor, Sorvall Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment vakuumgetrocknet (SpeedVac, Fa. Savant). Die DNS wurde anschließend in 300 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) gelöst und ein zweiter Fällungsschritt durch Zugabe von 30 µl 3 M Natriumazetat und 800 µl Ethanol angeschlossen, dabei verblieb das Gefäß für 30 Minuten bei -80°C. Wie nach der Isopropanol-Fällung wurde zentrifugiert, getrocknet und abschließend in 20 µl TE gelöst. Die derartig gereinigte DNS konnte nun mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und analysiert werden.

C.III.3.2. Präparation von supercoiled Plasmid DNS

Es wurde die von Maniatis et al. (1982) beschriebene Methode der Caesiumchlorid-Gleichgewichtszentrifugation angewandt:

5 ml LB - Medium wurden mit einer Öse der jeweiligen Glycerinkultur angeimpft. Das Medium enthielt 50 µg/ml Ampicillin. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37°C über Nacht mit 200 Upm geschüttelt. Mit 2,5 ml der erhaltenen Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium angeimpft (Hauptkultur). Das Medium enthielt 50 µg/ml Ampizillin. Die

Kulturen wurden bei 37°C mit 140 Upm geschüttelt, bis sie eine optische Dichte von 0,9 Einheiten bei 600 nm (Messung im Spektralphotometer der Fa. LKB) erreicht hatten, dies war in der Regel nach 4 - 6 Stunden der Fall. Dann wurden 150 µg/ml Chloramphenicol (Sigma) zugegeben. Nach weiteren 14-16 h Inkubationszeit wurden die Bakterienkulturen im GS-3 Rotor mit 8000 U/ min bei 4°C für 15 min zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge) und der Überstand dekantiert.

Der Aufschluß vollzog sich in 3 Schritten: Das Sediment wurde in 5 ml eiskalter Sucrose-Tris-Lösung (25% Sucrose; 0,05 M Tris-HCl pH 7,5) resuspendiert. Dann wurden erst 5 mg Lysozym (Sigma), dann 5 ml Triton-Lysis-Mix (0,1% Triton X-100, Sigma; 50 mM EDTA; 50 mM Tris pH 8,0) dazugegeben, jeweils danach das Gefäß mehrmals invertiert und 10 min im Eisbad inkubiert. Bakterielle DNS und Zellbestandteile wurden durch eine 30-minütige Zentrifugation mit 28.000 Upm im FW-35 Rotor (Beckmann LS-50 Ultrazentrifuge) bei 4°C abgetrennt.

Die Aufreinigung des plasmidhaltigen Überstandes geschah im Caesiumchlorid-Gradienten. Pro ml des erhaltenen Lysates wurden 1 g CsCl eingewogen und 50 µl einer 1%igen Ethidiumbromid-Lösung (Sigma) zugegeben. Nach 18-stündiger Zentrifugation in Beckmann Quickseal Röhrchen (25x89 mm) bei 47.000 Upm und 15°C im VTi 50 Rotor entstanden scharfe Plasmidbanden. Diese Banden wurden in UV Licht (360 nm) sichtbar und konnten mit Einmalspritze und -kanüle durch Perforation des Röhrchens abgezogen werden. Es schloß sich ein zweiter CsCl-Gradientenlauf an, dabei wurden unter ansonsten identischen Bedingungen wie im ersten Lauf Beckmann Quickseal Röhrchen (13x51 mm), sowie der VTi 65 Rotor verwendet, die Plasmidbanden wurden, wie oben für den ersten Lauf beschrieben, abgezogen.

Das Ethidiumbromid konnte durch dreimaliges Ausschütteln mit dem gleichen Volumen H₂O-gesättigtem Butanol weitgehendst aus der Plasmidpräparation entfernt werden, zur Erniedrigung der Salzkonzentration erfolgte eine Dialyse in Schleicher&Schüll Ultrahülsen gegen 2 l TE Puffer mit dreimaligem Pufferwechsel.

C.III.3.3. Präparation von zellulärer DNS und RNS

Zur Präparation beider Nukleinsäureklassen aus dem gleichen Ansatz von Zellen wurde nach dem von Günzburg und Salmons (1986) beschriebenen Verfahren vorgegangen.

Die Zellen (zwischen 5×10^6 und 1×10^7) wurden zweimal mit PBS gewaschen, durch zehnminütige Zentrifugation mit 2000 Upm in einer Heraeus Labofuge III sedimentiert und bei -70°C eingefroren. Zur Präparation der Nukleinsäuren wurde das Sediment in 3ml Guanidin-Isothiocyanat(GITC)-Lösung (6 M GITC, 5 mM Natriumzitat, 0,1 M β -Mercaptoethanol, 0,5% Natrium-Lauryl-Sarkosin) aufgetaut und auf ein Caesiumchloridkissen (2 ml, 5,7 M CsCl; 0,1 M EDTA) geschichtet. Die Auftrennung von DNS und RNS erfolgte durch 18-stündige Zentrifugation bei 40000 Upm in einer Beckmann LS-50 Ultrazentrifuge unter Verwendung des SW 50.1 Rotors.

Aus den Zentrifugenröhrchen wurde zunächst die oberste aus Protein bestehende Schicht abgenommen, dann 2 ml Flüssigkeit abgezogen, anschließend mit einer großlumigen Pipette die visköse DNS. Dann wurde die verbleibende Menge Flüssigkeit entfernt. Die am Boden des Zentrifugenröhrchens sedimentierte RNS wurde in 100 μl TE resuspendiert, durch Zugabe von 6,7 μl 3 M Natriumazetat pH 5,2 und 250 μl Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt, und anschließend im HB-4 Rotor 20 Minuten bei 4°C mit 10000 Upm sedimentiert. Das Sediment wurde

vakuumgetrocknet (Speedvac) und in 100 μ l TE aufgenommen. Die RNS-Lösung wurde danach nochmals mit 6,7 μ l 3 M Natriumazetat pH 5,2 und 250 μ l Ethanol gefällt und in dieser Form bei -20°C aufbewahrt.

Die stark visköse DNS wurde mit 3 ml Aqua dest. verdünnt, durch Zugabe von 8 ml Ethanol gefällt, mit einem Glashaken aus der Lösung entnommen und in ein neues Gefäß überführt. Dort wurde die DNS in 4 ml TE gelöst. Es wurden 100 μ l 20%iges Natrium-Dodezylsulfat (SDS, Merck) und 40 μ l Proteinase K (10 mg/ml, Merck) zugegeben und zur Entfernung von Proteinen bei 50°C über Nacht inkubiert. Die Lösung wurde dann zweimal phenolisiert (siehe Kapitel C.III.3.1.), Die DNS ein weiteres Mal im 2,5-fachen Volumen Ethanol gefällt, diesmal unter Zugabe von $\frac{1}{15}$ Volumen 3 M Natriumazetat, und wieder mit einem Glashaken entnommen. Die derartig gereinigte DNS wurde in 300 μ l TE aufgenommen und konnte nun analysiert werden.

C.III.4. DNS-Analysen

C.III.4.1. DNS-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNS-Lösung wurde durch Vergleich mit einer Standard-DNS-Lösung bekannter Konzentration ermittelt (Maniatis et al., 1982). Jeweils 2 μ l der Lösung wurden auf eine 1%ige Agaroseplatte getropft, die 5 μ g/ml Ethidiumbromid enthielt. Nachdem die Flüssigkeit eingetrocknet war, konnten die Intensitäten der gebildeten Ringe in UV-Licht (366 nm) verglichen werden.

C.III.4.2. Agarosegel-Elektrophorese

DNS-Fragmente sowie RNS-Moleküle können aufgrund ihrer negativen Ladung elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Zur Auftrennung der DNS-Fragmente wurden, wenn nicht anders angegeben, 0,8%ige Agarosegele verwendet, die 5 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Als Laufpuffer diente TEA (0,04 M Tris-Azetat; 0,5 M EDTA), angelegte Spannungen betrugen zwischen 20 und 100 Volt. Die DNS-Lösungen wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen "Blaumarker" (0,1% Bromphenolblau, 80% Glycerin) vermischt und in die Gelkammern eingebracht. Die DNS-Fragmente konnten aufgrund der Einlagerung des Ethidiumbromids in die DNS Doppelstränge im UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden.

C.III.4.3. Restriktionsenzym-Analyse

Für jedes Restriktionsenzym existieren optimale Reaktionsbedingungen bezüglich der Ionenzusammensetzung und -konzentration. Dem Restriktionsansatz wurden daher neben DNS und Enzym die benötigten Ionen in Form eines geeigneten 5- oder 10-fach konzentrierten Restriktionspuffers zugegeben. (Restriktionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM $MgCl_2$ und 0, 50, 100 oder 150 mM NaCl. Es wurden ausschließlich Restriktionsenzyme der Fa. Boehringer Mannheim verwendet.

Nach einer Inkubationsdauer, die aus der Menge der zu verdauenden DNS, der Anzahl der Schnittstellen sowie den Einheiten des zugegebenen Enzyms errechnet werden konnte (bei einer Temperatur von 37°C), wurden die erhaltenen DNS-Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und analysiert.

C.III.4.4. Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNS-Fragment wurde zunächst mittels Restriktionsverdau aus dem Plasmid herausgeschnitten. Der gesamte Restriktionsansatz wurde dann auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde in Laufrichtung hinter dem gewünschten DNS-Fragment ein Schlitz ins Gel geschnitten, der dazu diente, eine passend geschnittene NA 45 DEAE-Membran (Schleicher&Schuell) aufzunehmen (Winberg und Hammarskjold, 1980). Die Elektrophorese wurde dann solange weitergeführt, bis das Fragment vollständig an der Membran adsorbiert war.

Die DNS wurde nach einmaligem Waschen in NET-Puffer (0,15 M NaCl; 0,1 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8) durch 30 minütige Inkubation in hNET (1 M NaCl; 0,1 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8) bei 60°C eluiert. Das in der DNS enthaltene Ethidiumbromid wurde durch dreimalige Extraktion mit einem gleichen Volumen wassergesättigtem Butanol entfernt. Schließlich wurde die so gewonnene DNS-Fragment-Lösung mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gefällt und in TE aufgenommen.

C.III.4.5. ^{32}P -Markierung von DNS-Fragmenten (Multiprime-Reaktion)

Die radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten wurde nach den Angaben des Herstellers (Amersham) mit dem Multiprime Kit durchgeführt. Folgende Modifikation wurde dabei vorgenommen: Der gesamte Ansatz wurde von 50 auf 25 μl halbiert, nur die verwendete Menge $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham) blieb unverändert.

50 ng DNS in H₂O wurden in einem Volumen von 11,5 µl 10 min lang auf 95°C erhitzt, dann auf Eis abgekühlt. Der dadurch denaturierten DNS wurden dann zugegeben:

Lösung 1 (Puffer und dNTPs)	5,0	µl
Primer	2,5	µl
α ³² P-dCTP (50 µCi, 3000 Ci/mMol)	5,0	µl
Enzym (Klenow-Fragment)	1,0	µl

Die Inkubationszeit betrug 3 h bei Raumtemperatur.

Zur Bestimmung der Einbaurrate der radioaktiven Nuklide wurden 2 µl des Ansatzes mit H₂O 1:20 verdünnt, und davon jeweils 2 µl auf ein DE 81 Filter (Whatman) getropft. Eines der Filter wurde zur Entfernung der freien Nukleotide 3 x 5 Minuten in 0,5 M Na₂HPO₄ und 2 x in 95% Ethanol gewaschen. Die Filter wurden unter einer Infrarotlampe getrocknet und in ein Szintillationsröhrchen gelegt. Nach Zugabe von 5 ml Quickszint 501 (Zinsser) wurde die Impulsrate über eine Minute (cpm) in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Kontron) bestimmt. Die Einbaurrate entsprach dem Quotienten auf dem gewaschenen und dem ungewaschenen Filter. Sie lag in allen Fällen zwischen 60 und 90%. Die Gesamtausbeute wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtausbeute} = \text{cpm [gew. Filter]} \times 20 \times 12,5 \\ (\text{Verd.}) \quad (25 \mu\text{l}/2 \mu\text{l})$$

Die Gesamtausbeute betrug in allen Fällen zwischen 6×10^7 und 1×10^8 cpm.

C.III.4.6. DNS-Transfer auf Nitrozellulose-Membranen (Southern-Blotting)

Der Transfer von DNS aus Agarosegelen auf eine Membran (Southern, 1975) dient zur Hybridisierung mit einer markierten komplementären Nukleinsäure. Die Effizienz des Transfers hängt von der DNS-Molekülgröße ab. Daher wurde das Gel für 15 Minuten in 0,25 M HCl-Lösung geschwenkt. Dies bewirkt Einzelstrangbrüche und erleichtert den Transfer der hochmolekularen DNS. Da die DNS nur als Einzelstrang an die Membran bindet und zur Hybridisierung auch als Einzelstrang vorliegen muß, wurde sie zunächst denaturiert. Dies geschah durch 45-minütige Inkubation in der Denaturierungslösung (0,3 M NaOH; 0,6 M NaCl). Anschließend wurde das Gel weitere 45 Minuten in Neutralisierungslösung (0,6 M NaCl, 1 M Tris pH 7,5) bewegt.

Für die Übertragung der DNS-Fragmente auf Nitrozellulose wurde das vorbehandelte Gel auf 2 Lagen Whatman 3MM Papier (Schleicher&Schuell) gegeben, die zuvor mit 20x SSC (1x SSC: 0,15 M NaCl; 15 mM Natriumzitat) getränkt worden waren, und deren Enden in einen Vorrat (ca. 2 l) der gleichen Salzlösung eintauchten. Auf das Gel wurde eine mit 3x SSC gesättigte Nitrozellulosemembran (BA 45, 0,45 µm, Schleicher&Schuell) blasenfrei aufgelegt und die Ränder mit Haushaltsfolie bedeckt. Darauf folgten mehrere Schichten trockenen, saugfähigen Papiers. Mit Hilfe eines Gewichtes (ca. 1 kg) wurden die einzelnen Lagen zusammengepreßt. Der Transfer der DNS geschah über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dem Transfer wurden die Filter zunächst für 10 min. in 6 x SSC inkubiert und anschließend an der Luft getrocknet. Die Fixierung der DNS erfolgte durch Erhitzen für 2 h bei 80°C. Bei in dieser Weise vorbehandelten Membranen wurden in der Folge für Hybridisierungsexperimente eingesetzt.

C.III.4.7. Southern Blot Hybridisierung

Da ausnahmslos homologe Nukleinsäuren zu detektieren waren, wurde unter stringenten Bedingungen (42°C; 50% Formamid) hybridisiert.

Die Nitrocellulosefilter wurden in Plastikfolien eingeschweißt und zur Verminderung unspezifischer Signale für zwei Stunden im Vorhybridisierungsmix inkubiert (10 ml Formamid; 5 ml 20x SSC; 140 mg Magermilch-Pulver (Glücksklee); ad 20 ml H₂O).

Anschließend wurde der Vorhybridisierungsmix durch den Hybridisierungsmix (5 ml Formamid; 2,5 ml 20x SSC; 70 mg Magermilch-Pulver; 0,2 ml NaH₂PO₄; ad 10 ml H₂O) ersetzt. Letzterem wurden 2×10^7 cpm der radioaktiv markierten DNS-Sonde, die durch 10 minütige Erhitzung auf 95°C denaturiert worden war, zugegeben. Die Hybridisierungsdauer betrug 18 h.

Es folgte das Waschen der Filter zunächst in Waschlösung 1 (0,5x Denhardt's¹; 2x SSC; 0,1% SDS) für 30 Minuten, dann 3x 5 Minuten in Waschlösung 2 (2x SSC; 0,1% SDS) und abschließend solange bei 65°C in Waschlösung 3 (0,1% SSC; 0,1% SDS), bis die abgestrahlte Aktivität unmittelbar vor einem Kontaminationsmonitor (Berthold 1210 B) ≤ 20 ipm betrug.

Die Filter wurden kurz luftgetrocknet, in dünne Plastikfolien eingeschweißt und für die Autoradiographie mit Röntgenfilmen und 2 Verstärkerfolien (CURIX MR 600) bei -70°C je nach Signalstärke einen oder mehrere Tage lang exponiert.

¹ 50x Denhardt's: je 5 g Ficoll; 5 g Polyvinylpyrrolidon; 5 g BSA;
ad 500 ml H₂O

C.III.5. RNS-Analysen

C.III.5.1. RNS-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer RNS-Lösung wurde nach dem gleichen Verfahren wie die der DNS bestimmt.

C.III.5.2. RNS Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNS (Maniatis et al., 1982) unterscheidet sich von der der DNS dadurch, daß die durch Basenpaarungen entstandenen Sekundärstrukturen der einzelsträngigen RNS vor dem Lauf aufgelöst werden müssen, um eine der RNS-Länge proportionale Laufgeschwindigkeit zu erreichen. Dies geschah durch Vorbehandlung mit 1M Glyoxal und 50% DMSO bei 50°C über 2 Stunden.

Dazu wurden jeweils 15µg RNS in der Speedvac getrocknet und in 24µl des im folgenden beschriebenen Glyoxylierungsmixes gelöst.

52	µl	DEPC-H ₂ O ¹
4	µl	0,5M Na-P ² pH 7,0
44	µl	4,5M Glyoxal (deionisiert, 30%, Merck)
100	µl	DMSO

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,2%iges Agarosegel in 80 ml 0,01M DEPC-H₂O hergestellt. Als Laufpuffer wurde 0,01M Na-P verwendet. Um einen stabilen pH-Wert zu gewährleisten, wurde der Puffer kontinuierlich durch einen an der Elektrophoresekammer extern angebrachten Plastikschlauch

¹ Aqua dest. wurde mit Diethyl-Pyrocbonat (DEPC) vorbehandelt, um jegliche RNase Aktivität zu zerstören.

² "Na-P": 0,5 M Na₂HPO₄ und 0,5M NaH₂PO₄ wurden in einem solchen Verhältnis gemischt, daß ein pH Wert von 7,0 erreicht wurde.

von der Kathode zur Anode umgewälzt. Die Elektrophorese dauerte 3 Stunden bei einer Spannung von 40 Volt.

C.III.5.3. RNS Transfer auf Zetaprobe Membranen (Northern Blotting)

Der Transfer von RNS aus einem Agarosegel auf die Zetaprobe Membran (Thomas, 1980) geschah analog zum DNS-Transfer auf Nitrozellulose Membranen (Southern Blot, vgl. C.3.4.6.).

Da die RNA bereits durch Glyoxal denaturiert war, mußte sie nicht nochmals denaturiert werden. Sie wurde daher unbehandelt durch die Kapillarwirkung über Nacht auf eine Zetaprobe-Membran (Biorad) überführt. Im Anschluß wurde die Membran zum Zweck einer dauerhaften Fixierung der RNS eine Stunde lang bei 80°C gebacken.

C.III.5.4. Northern Blot Hybridisierung

Die Zetaprobe Membran wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 10 Minuten mit 10 ml Vorhybridisierungsmix (7% SDS; 0,5 M Na-P) bei 65°C vorhybridisiert. Die Hybridisierung fand in 7,5 ml der gleichen Lösung statt, der jetzt zusätzlich $1,5 \times 10^7$ cpm der ^{32}P -markierten DNS-Sonde zugegeben worden waren. Die Hybridisierungsdauer betrug 16 Stunden, die Temperatur 65°C.

Die Membranen wurden dann zweimal 30 Minuten bei Raumtemperatur und zweimal 30 Minuten bei 65°C in 50 mM Na-P mit 1% SDS gewaschen, luftgetrocknet und für 1 bis 5 Tage mit Röntgenfilmen (X-OMAT, Kodak) zwischen 2 Verstärkerfolien (CURIX MR 600) exponiert.

C.IV. Enzymnachweise

C.IV.1. Gewinnung von Zellextrakten und Proteinbestimmung

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen, dann in TEN-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA; 10 mM NaCl) abgeschabt. Die Zellen wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und in 100 μ l 100 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert. Um eine möglichst vollständige Lysis der Zellen zu erreichen, wurden diese in 3 Zyklen in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem auf 37°C erwärmten Wasserbad aufgetaut.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes eines Zellextraktes wurde die veränderte Extinktion von Coomassie Brilliant Blue (CBB) nach Reaktion mit Proteinen verwendet (Bradford, 1976). Für die Herstellung von einem Liter Farblösung wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G (Serva) in 50 ml absolutem Ethanol gelöst und eine Stunde lang gerührt. Nach Zugabe von 100 ml konzentrierter Phosphorsäure wurde weitere fünf Minuten gerührt, 850 ml destilliertes Wasser zugegeben und die Farblösung filtriert.

In Mikrotiterplatten wurden zu 230 μ l CBB 20 μ l einer geeigneten Verdünnung der Zellextrakte gegeben. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 577 nm photometrisch (SLT Elisareader, SLT Labinstruments) gemessen. Durch Vergleich dieser Werte mit einer Standard-Eichgeraden aus Rinderserum-Albumin konnte die Proteinkonzentration errechnet werden.

C.IV.2. Nachweis der Chloramphenicol-Azetyltransferase (CAT-Assay)

C.IV.2.1. CAT-Assay mittels Dünnschichtchromatographie

Es wurde die von Gorman et al. (1982) beschriebene Methode verwendet. Von dem Zellextrakt wurde die gewählte Menge Protein (zwischen 35 und 100 µg) mit 100 mM Tris-HCl pH 8,0 auf ein Volumen von 150 µl aufgefüllt. Dazu wurden 25 µl 4 mM Azetyl-Coenzym A (Boehringer-Mannheim) und 0,1 µCi ^{14}C -Chloramphenicol (57,8 µCi/mmol, NEN-DuPont) gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 45 Minuten im Wasserbad bei 37°C.

Dann wurde das Chloramphenicol zweimal mit jeweils 400 µl 4°C kaltem Ethylazetat extrahiert, wobei die obere, organische Phase in ein neues Gefäß überführt wurde. Der Extrakt wurde nun vakuumgetrocknet (20 Minuten, SpeedVac, Fa. Savant). Die Proben wurden in 20 µl Ethylazetat gelöst, auf Dünnschicht-Kieselgelplatten (DC-Plastikfolien Kieselgel 60, Merck) aufgetragen und mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol (95:5) entwickelt.

Ein Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak) wurde, je nach Stärke der Signale, über 3-20 Tage mit der DC Platte zwischen 2 Verstärkerfolien (CURIX MR 600) exponiert. Diese Autoradiographie wurde durch densitometrische Messung (Laser Densitometer, LKB) ausgewertet (siehe Abb.2).

Die CAT-Assays der transienten Transfektionen wurden immer im Dünnschichtchromatographieverfahren (DC) ausgewertet, da dieses gegenüber der Alternative der Auswertung im Flüssigkeitsszintillationszähler eine höhere Sensitivität aufwies.

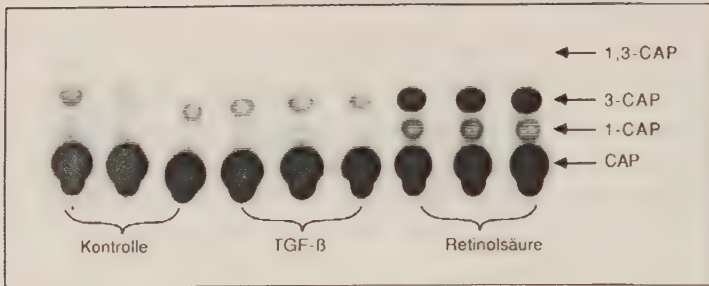


Abb.2:

CAT-Assay im Dünnschichtchromatographieverfahren (DC):

Autoradiographie nach 20-tägiger Exposition der DC Platte.
(Transiente Transfektion von ROS 17/2.8 Zellen mit pRFB CAT und
Behandlung mit TGF- β und Retinolsäure).

Chloramphenicol (CAP) wird in Anwesenheit von Azetyl Coenzym A am 1- und 3-C-Atom durch die Wirkung der Chloramphenicol-Azetyltransferase (CAT) azetyliert. Als Reaktionsprodukte entstehen das 1-Azetyl-CAP, das 3-Azetyl-CAP und das 1,3-Diazetyl-CAP. Für die quantitative Auswertung wurde im DC-Verfahren das stärkste Signal, das 3-Azetyl-CAP verwendet.

C.IV.2.2. CAT-Assay im Flüssigkeitsszintillationszähler

Von dem Zellextrakt wurde in einem 25 ml fassenden Szintillationsröhrchen die gewählte Menge Protein mit 100 mM Tris-HCl pH 8,0 auf 50 μ l aufgefüllt. Dazu wurden 200 μ l Chloramphenicol (1,25 mM in 100 mM Tris-HCl pH 8) und 0,1 μ Ci 14 C-Azetil-Coenzym A (4,0 mCi/mmol, NEN-DuPont) gegeben (Neumann et al., 1987).

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig mit 5 ml Econofluor (NEN-DuPont) überschichtet. Dieser Szintillationscocktail ermöglicht bei fortschreitender Reaktion (Azetylierung des Chloramphenicols) eine Diffusion des nun radioaktiv markierten Reaktionsprodukts in die hydrophobe Szintillatorphase. Dadurch wird nur der Anteil der Radioaktivität für die Messung verstärkt, der mit dem Substrat durch die Wirkung des zu quantifizierenden Enzyms gekoppelt wurde.

Diese Anordnung erlaubt im Gegensatz zum DC-Verfahren (Endpunktmessung) Messungen zu beliebig wählbaren Zeitpunkten der Reaktion, hat aber den Nachteil der geringeren Empfindlichkeit, da naturgemäß immer ein Hintergrundsignal (ca. 2000 cpm) auftritt, was beim DC-Verfahren nicht der Fall ist. Jede Probe wurde über 1 Minute im 14 C-Fenster eines Flüssigkeitsszintillationszähler der Fa. Kontron gemessen. Die erste Messung fand unmittelbar nach Reaktionsbeginn statt, und dann noch ein- oder mehrmals nach frühestens 30 Minuten. Zur Auswertung gelangten nur die Meßwerte, die bei mindestens 6000 cpm lagen.

Die CAT-Assays der stabilen Transfektionen wurden immer im Flüssigkeitsszintillationszähler ausgewertet, da hier eine höhere CAT Expression/Zellzahl bestand.

C.IV.3. Nachweis der Alkalischen Phosphatase

Die Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) in Knochenzellen erfolgte nach dem von Schmidt et al. (1987) beschriebenen Verfahren. In Mikrotiterplatten wurden zu 180 μ l Substratlösung (1 M Diethanolamin pH 9,8; 0,5 mM $MgCl_2$; 15 mM Paranitrophenylphosphat) 20 μ l Zellextrakt in geeigneter Verdünnung (unverdünnt bis 1:200) gegeben. Die Extinktion wurde nach genau 5 und 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur photometrisch (SLT Elisareader, SLT Labinstruments) bei 404,7 nm gemessen. Durch Vergleich der Zellextrakt-Meßwerte mit mit einer unter gleichen Bedingungen hergestellten Standard-Eichgeraden aus Rinderdarm-ALP (Sigma) wurde die ALP-Aktivität pro Ansatz bestimmt. Dieser Wert wurde auf die Proteinmenge des selben Zellextraktes bezogen und als spezifische ALP Aktivität in mU/ μ g Protein angegeben.

D. Ergebnisse

D.I. Knochenzell Differenzierung und LTR Aktivität knochenpathogener Retroviren

Es sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad einer osteogenen Zelle und der Expression knochenpathogener Retroviren besteht.

Die aus einem Rattenosteosarkom etablierte Zelllinie ROS 17/2.8 verhält sich *in vitro* knochenzelltypisch, sowohl morphologisch als auch in der Expression von knochentypischen Genen (Rodan und Rodan, 1984). Die Zelllinie differenziert im Verlauf der Zellkultur. Die Höhe der Expression der Alkalischen Phosphatase (ALP) wurde als Maß für den Grad der osteogenen Differenzierung gewählt. Der Einfluß, den die ROS 17/2.8 Zelllinie im Verlauf ihrer Differenzierung auf die Expression von Genomen knochenpathogener muriner Leukämieviren nimmt, sollte mit Hilfe des CAT Reporter Gens, das mit den Promoter und Enhancersequenzen von Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV rekombiniert worden war, untersucht werden.

D.I.1. Etablierung differenzierungsmodulierender Substanzen

Durch Behandlung der ROS 17/2.8 Zelllinie mit TGF- β läßt sich die Expression der ALP verstärken (Noda und Rodan, 1987), mit Retinolsäure vermindern (Imai et al., 1987). Da eine Aussage darüber gemacht werden sollte, ob der Differenzierungsgrad der Knochenzelle einen Einfluß auf die LTR Aktivität ausübt (mittelbare Wirkung), mußte eine unmittelbare Wirkung dieser Substanzen auf die LTRs ausgeschlossen werden. Dazu wurde die ROS 17/2.8 Zelllinie mit dem rekombinanten RFB-CAT Vektor transient transfiziert und

für jeweils 24 Stunden mit 1ng/ml TGF- β , bzw. 10^{-6} M Retinolsäure behandelt (in diesem kurzen Zeitraum ist eine Veränderung des Differenzierungsgrades noch nicht zu erwarten).

In den beiden Zelllinien ROS 17/2.8 und ROS 25/1 ergab sich bei 24 stündiger Behandlung mit 1ng/ml TGF- β keine Veränderung der CAT Aktivität gegenüber der Kontrolle, dagegen war nach Behandlung mit Retinolsäure ein Anstieg um das 3- bzw. 4-fache zu beobachten.

Daraus kann geschlossen werden, daß TGF- β keine unmittelbare Wirkung auf die LTR Aktivität ausübt, und in dem beschriebenen System eingesetzt werden kann. Im Gegensatz dazu aktiviert Retinolsäure die LTRs unmittelbar, kann also in diesem System nicht angewandt werden. Die LTR aktivierende Wirkung der Retinolsäure wird in einem späteren Kapitel beschrieben.

Die Ergebnisse sind in Abb.3 dargestellt (siehe auch Abb.1). Daraus kann geschlossen werden, daß TGF- β keine unmittelbare Wirkung auf die LTR Aktivität ausübt, und in dem beschriebenen System eingesetzt werden kann. Im Gegensatz dazu aktiviert Retinolsäure die LTRs unmittelbar, kann also in diesem System nicht angewandt werden. Die LTR aktivierende Wirkung der Retinolsäure wird in einem späteren Kapitel beschrieben.

Die Ergebnisse sind in Abb.3 dargestellt (siehe auch Abb.1).

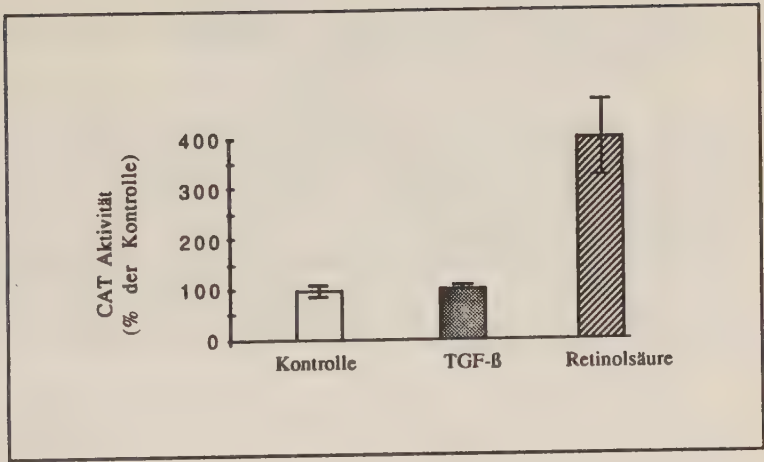


Abb.3:

LTR Aktivität von RFB MuLV nach transients Transfektion von ROS 17/2.8 Zellen und Behandlung mit TGF- β und Retinolsäure über 24 Stunden.

D.I.2. Etablierung stabil transfizierter Zellen

D.I.2.1. Stabile Transfektion osteogener Zellen mit rekombinanten Plasmidvektoren

Da die Differenzierung der Knochenzellen über mehrere Tage abläuft, sollte die Expression des Reportergenese über einen längeren Zeitraum hinweg untersucht werden. Bei der transienten Transfektion von Plasmiden nimmt deren Konzentration in den Zellen im Verlaufe der Zellteilungen ab. Aus diesem Grund sollten die Reporterplasmide stabil in das zelluläre Genom eingebaut werden (stabile Transfektion).

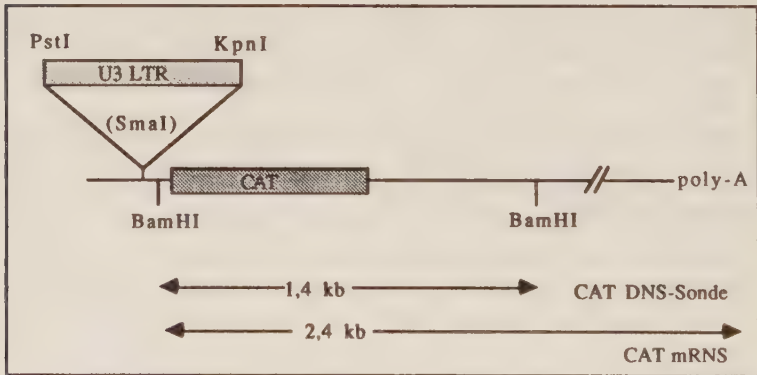


Abb.4:

Schema der rekombinanten CAT Vektoren

Zur Etablierung stabil transfizierter Zellen muß ein selektierbarer Marker miteingeführt werden. Hier wurde das Neomycin-Resistenzgen im pSV2 neo Vektor im Verhältnis von 1:15 zu den rekombinanten Virus-LTR-CAT Vektoren eingesetzt. Dies ermöglichte aufgrund der Behandlung der

Zellen mit dem Neomycinanalog G 418 die Selektion derjenigen Zellen, in deren Chromosomen beide Plasmide integriert waren.

D.I.2.2. Nachweis der Integration der Vektoren

Für den Nachweis, daß die CAT-Vektoren in die chromosomale DNS der 17/2.8 Zellen integriert waren, wurde eine für das CAT-Gen spezifische DNS-Sonde verwendet. Diese wurde nach Bam HI-Restriktionsverdau aus dem pAkv CAT Plasmid präpariert und enthielt die gesamte Sequenz des CAT Gens (Abb.4). Die zelluläre DNS wurde ebenfalls mit Bam HI verdaut.

Die DNS der Zelllinien 17RC2, 17OC2 und 17AC4 zeigten nach Hybridisierung mit dem CAT Gen jeweils eine Bande, die einer Molekülgröße von 1,4 kb entsprach (Abb.5). Daraus konnte geschlossen werden, daß die Plasmide in die chromosomale DNS integriert waren.

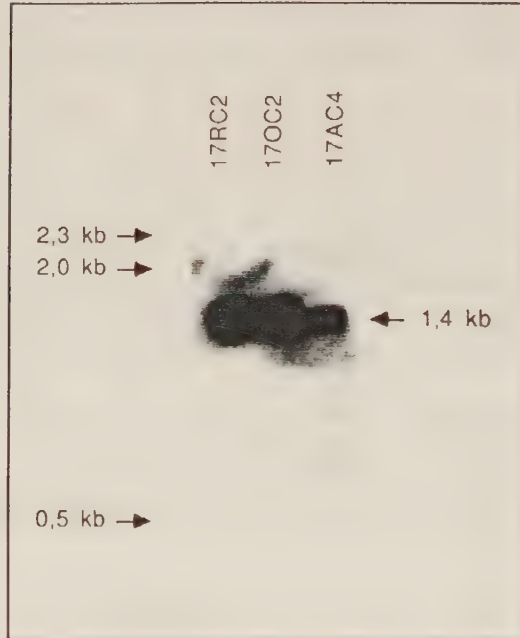


Abb.5:

Nachweis der Integration der CAT Vektoren durch Southern Blot Hybridisierung der Bam HI-verdauten chromosomalen DNS aus 17RC2, 17OC2 und 17AC4 Zellen mit einer CAT spezifischen DNS Sonde.

D.I.2.3. Nachweis der Expression des CAT Gens

Die Expression der integrierten CAT Konstrukte wurde mit Hilfe der Northern Blot Hybridisierung nachgeprüft.

Auf der Autoradiographie (Abb.6) nach der Northern Blot Hybridisierung mit der CAT-spezifischen DNS-Sonde war zu erkennen, daß bei den stabil transfizierten Zelllinien 17RC2, 17OC2, 17AC4 und 17SC2 eine Bande auftrat, die einer Basenlänge von 2,4 kb entsprach. Diese Größe entspricht der erwarteten CAT m-RNS Länge (Abb.4). Daraus konnte geschlossen werden, daß die stabil transfizierten CAT Plasmide korrekt transkribiert wurden.

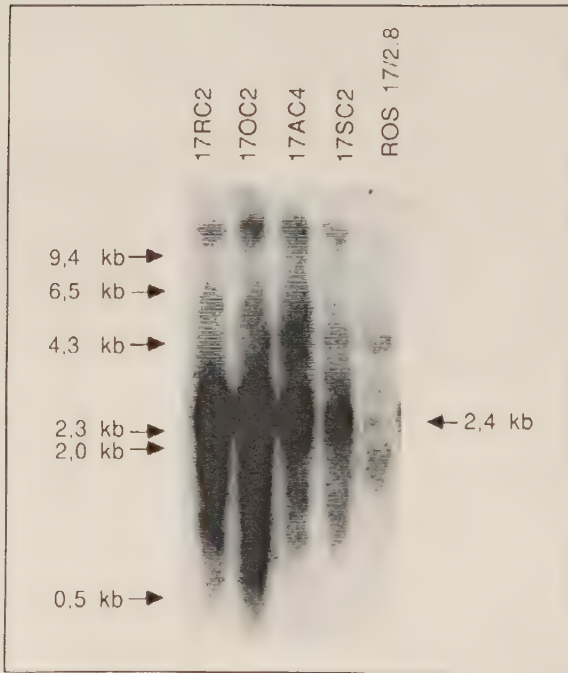


Abb. 6:

Nachweis der Expression der integrierten CAT Vektoren durch Northern Blot Hybridisierung der RNS aus 17RC2, 17OC2, 17AC4 und 17SC2 Zellen mit einer CAT spezifischen DNS Sonde.

D.I.3. Knochenzelldifferenzierung und LTR Aktivität

Damit war die Grundlage geschaffen, verschiedene LTR-CAT Konstrukte im Verlauf der Knochenzelldifferenzierung zu untersuchen. Nun sollte festgestellt werden, ob zwischen der LTR Aktivität von verschiedenen murinen knochenpathogenen Retroviren wie Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV in stabil transfizierten ROS 17/2.8 Zellen und der Expression des knochenspezifischen Markers Alkalische Phosphatase (ALP) eine Korrelation besteht. Die ALP Expression nimmt in der ROS 17/2.8 Zelle spontan im Verlauf der Kultur mit der Zelldichte zu. Durch Zugabe von TGF- β kann diese Zunahme der ALP Expression nochmals gesteigert werden.

D.I.3.1. Spontane osteogene Differenzierung und LTR Aktivität

In der 17OC2 Zelle, die das pOA CAT Plasmid (dem Reporterplasmid für den LTR von OA MuLV) stabil integriert hatte, wurden die ALP und CAT Aktivitäten im Verlauf von 10 Kulturtagen verglichen. Das Medium war jeweils einen Tag vor der Ernte gewechselt worden.

Die Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase sind in Abb.7 dargestellt. Der Wert für die Alkalische Phosphatase steigt kontinuierlich von 0,19 mU/ μ g Protein am Tag 1 über 0,87 und 1,80 an den Tagen 4 und 7 auf 6,17 mU/ μ g Protein am Tag 10. Die CAT Aktivitäten liegen an den Tagen 1 und 10 um 9500 cpm, an den Tagen 4 und 7 um 6000 cpm/15 μ g Protein nach einstündiger Reaktion.

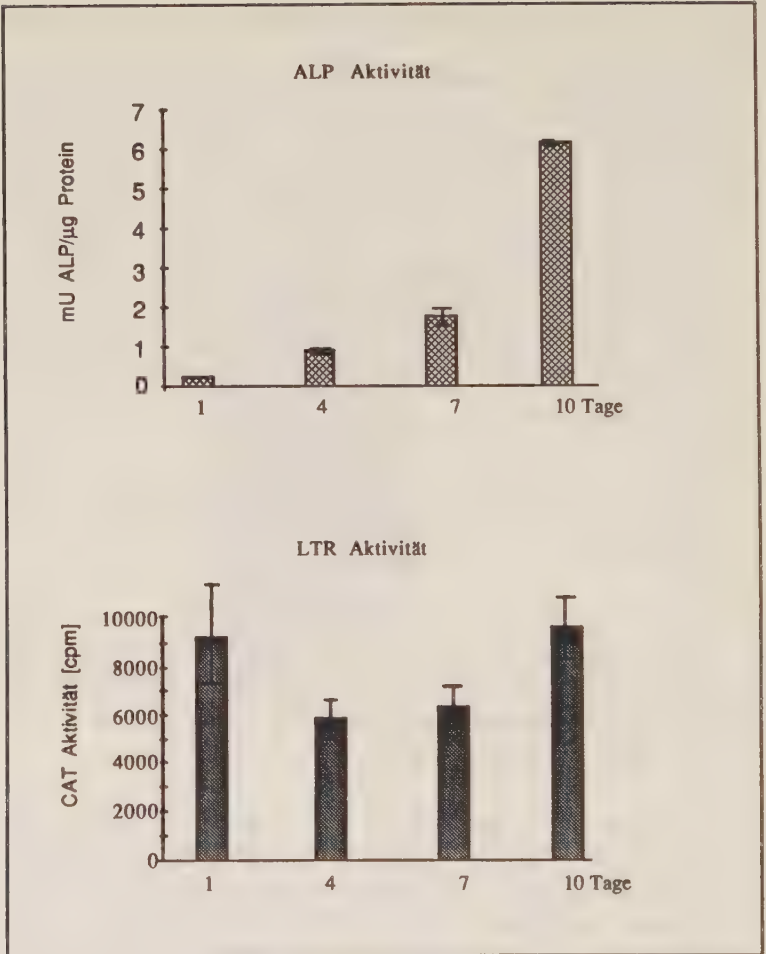


Abb.7:

Einfluß der Kultivierungsdauer von ROS 17/2.8 Zellen auf die ALP Expression und auf die LTR Aktivität von OA MuLV

D.I.3.2. Induzierte osteogene Differenzierung und LTR Aktivität

ROS 17/2.8 Zellen, die mit den LTR-CAT Konstrukten von RFB MuLV, OA MuLV und Akv MuLV bzw. mit dem SV 40 Promoter SV2 stabil transfiziert waren (17RC2, 17OC2 und 17AC4 sowie 17SC2), wurden nach 1, 4 und 7 Tagen Zellkultur mit 1 ng/ml TGF- β behandelt, die Ernte erfolgte am Tag 8.

Die Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase mit und ohne TGF- β Induktion sind in Abb.8 dargestellt. Nach Behandlung der Zellkulturen mit TGF- β stieg die ALP bei 17RC2 auf 325%, bei 17OC2 auf 500%, bei 17AC4 auf 350% und bei der 172C2 Kontrolle auf 800% gegenüber den jeweiligen uninduzierten Zellkulturen. Die CAT Aktivitäten in den selben Kulturen betrugen +13, -22, -35 und -22% im Vergleich zu den uninduzierten.

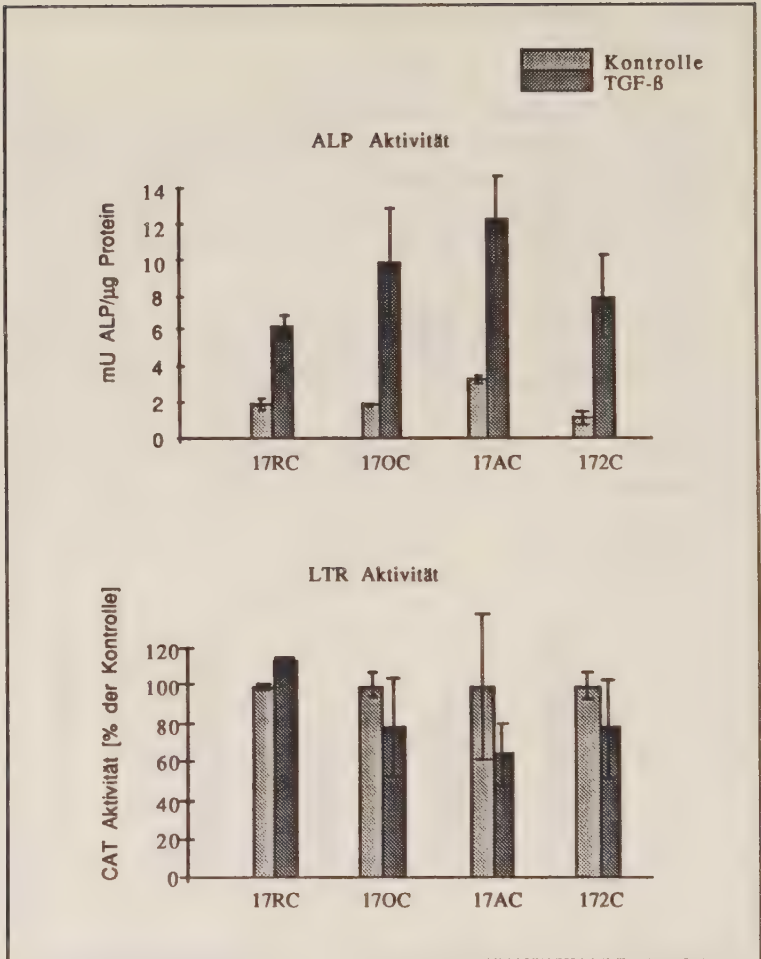


Abb.8:
Einfluß der TGF- β Behandlung von ROS 17/2.8 Zellen auf die ALP Expression und auf die LTR Aktivität von Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV nach 8tägiger Zellkultur

Diese Ergebnisse können folgendermaßen zusammengefaßt werden: Die mit den Reporterplasmiden stabil transfizierten ROS 17/2.8 Zellen haben die Fähigkeit zur Differenzierung *in vitro* behalten, wie aus dem Anstieg der ALP Expression sowohl im Verlauf der Kulturdauer als auch nach Behandlung mit TGF- β ersichtlich ist. Die CAT Aktivität bleibt in beiden Fällen im wesentlichen unverändert. Eine Korrelation zwischen Expression der Alkalischen Phosphatase und der CAT Aktivität besteht unter diesen Bedingungen nicht.

D.II. Einfluß von Hormonen auf die LTR Aktivität

Die LTR Aktivität und damit die Virusexpression kann durch Hormone reguliert werden. So aktivieren Glukokortikoide einen zellulären Rezeptor, der wiederum an ein "Glukokortikoid responsive element" (GRE) bindet und dadurch die Transkriptionsrate erhöht. RFB MuLV, OA-MuLV und Akv-MuLV enthalten GREs. Retinolsäure aktiviert die LTR von RFB MuLV. Über die Anwesenheit von "Retinolsäure responsive elements" in den genannten Viren ist bisher nichts bekannt. Es sollte untersucht werden, inwieweit diese Substanz die LTR Aktivität knochenpathogener Retroviren beeinflusst.

Sowohl Glukokortikoide als auch Retinolsäure haben einen (allerdings gegensätzlichen) Effekt auf die Knochenzellendifferenzierung, der in der ROS 17/2.8 Zelle nach mehreren Tagen der Einwirkung zum Tragen kommt: Dexamethason induziert, Retinolsäure verhindert die osteogene Differenzierung dieser Zellen *in vitro*. Die Dauer der Behandlung wurde mit 24h also kurz gehalten, um nur den unmittelbaren Effekt der Behandlung auf die LTR Aktivität zu erfassen.

Für diese Untersuchungen wurden ebenfalls stabil transfizierte ROS 17/2.8 Zellen verwendet. Hier wurde als zusätzliche Kontrolle eine mit pMMTV CAT stabil transfizierte Zelle

eingesetzt: Die LTRs des nicht knochenpathogenen Mouse Mammary Tumor Virus enthalten ein GRE, das von einer geringen Basisaktivität aus sehr stark induzierbar ist.

Die Behandlung der stabil transfizierten Zellen mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason erzeugte eine Steigerung der CAT Aktivität bei der RFB LTR auf 205%, der OA LTR auf 172% und der Akv LTR auf 295% der unbehandelten Kontrollen. Während sich bei SV2 keine Änderung zeigte (93%), stieg bei MMTV der Wert um den Faktor 24 an.

Retinolsäurebehandlung erhöhte die CAT Aktivität auf jeweils 192, 127 und 182% der unbehandelten Kontrollen. Hier sank die Aktivität von SV2 auf 75%, die von MMTV auf 87%.

Die gleichzeitige Behandlung mit beiden Substanzen bewirkte Steigerungen der CAT Aktivität auf 268, 124 und 267% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, also eine weitere Steigerung gegenüber den jeweiligen Zugaben von Dexamethason oder Retinolsäure, während SV2 und MMTV sich genauso verhielten wie bei alleiniger Zugabe von Dexamethason.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die LTRs von Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV durch Dexamethason und Retinolsäure unabhängig voneinander induziert werden können. OA MuLV zeigt bei Retinolsäure die schwächste Induktion, daß diese jedoch möglich ist, zeigt die weitere Steigerung um 30% (von 172 auf 224% relativ zur Kontrolle) nach Behandlung mit beiden Substanzen gegenüber Dexamethason alleine. Die Retinolsäureinduzierbarkeit dieser knochenpathogenen Leukämieviren ist keine allgemeine Eigenschaft muriner Retroviren, wie der Vergleich mit der MMTV LTR zeigt. Die Ergebnisse sind in Abb.9 gezeigt.

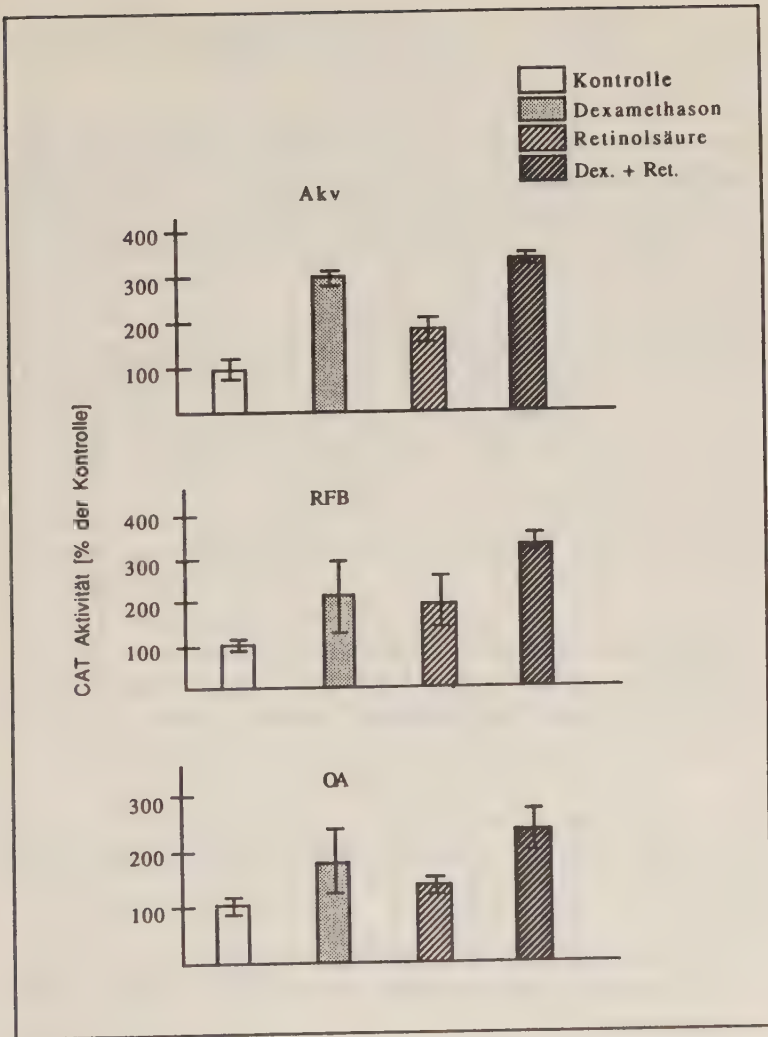


Abb.9:

LTR-Induzierbarkeit von Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV sowie SV2 und MMTV durch Dexamethason und Retinolsäure in stabil transfizierten ROS 17/2.8 Zellen.

D.III. Einfluß des c-fos Onkogens auf die Transkription knochenpathogener Retroviren

Das fos Onkogen kann bei konstitutiver Expression in c-fos transgenen Mäusen Differenzierungsstörungen und maligne Knochenveränderungen verursachen (Rüther et al. 1987 und Manuskript eingereicht). Das Fos Protein kann die Transkription durch Bindung an den Transkriptionsfaktor jun/AP1 regulieren (Sassone-Corsi et al., 1988a; Chiu et al., 1988). Es sollte daher untersucht werden, ob und in welchem Maße die c-fos Expression die transkriptionelle Regulation des knochenpathogenen Akv MuLV als Vertreter eines knochenpathogenen endogenen Retrovirus beeinflusst. Um eine konstitutive Expression des c-fos Onkogens zu erreichen, wurde ein Expressionsvektor, der das zelluläre c-fos Onkogen der Maus unter der Kontrolle des Metallothionin Promoters enthält (p76/21, Rüther et al., 1985), in die osteogene ROS 17/2.8 Zelle transfiziert. Die Auswirkung auf die Regulation der Virus-transkription wurde durch Messung der Aktivität des CAT Reportergens festgestellt, das mit dem viralen LTR rekombiniert war und ebenfalls in die Zellen transfiziert wurde.

Es wurden drei unterschiedliche Ansätze versucht, um die Mengenverhältnisse zwischen den beiden Plasmiden zu variieren:

- die transiente Kotransfektion beider Plasmide
- die transiente Transfektion des c-fos Plasmids in pAkv CAT transgene Zellen
- die transiente Transfektion des pAkv Plasmids in c-fos transgene Zellen.

Kotransfektion osteogener Zellen mit dem c-fos Expressionsvektor und pAkv CAT

Der c-fos Expressionsvektor p76/21 wurde gemeinsam mit pAkv CAT in ROS 17/2.8 Zellen transient transfiziert. Von beiden Plasmiden wurden pro Transfektionsansatz jeweils 5 µg eingesetzt, die für die Transfektion erforderliche Gesamtmenge von 20 µg ergab sich aus der Zugabe von 10 µg Heringssperma DNA.

Die Bestimmung der CAT Aktivität im Dünnschichtchromatographieverfahren nach zweitägiger Zellkultur ergab für die c-fos Kotransfektion eine Absorption von $0,51 \pm 0,3$; für die Kontrolle $0,60 \pm 0,04$ Einheiten.

Transfektion pAkv CAT transgener Zellen mit dem c-fos Expressionsvektor

ROS 17/2.8 Zellen, die das pAkv CAT Plasmid stabil integriert hatten ("17AC3", siehe Kapitel C.2.3.2.), wurden mit dem c-fos Expressionsvektor transient transfiziert. Pro Ansatz wurden 2×10^5 Zellen mit 1 µg des c-fos Expressionsvektors p76/21 bei einer Gesamtmenge von 4 µg DNA transfiziert.

Nach zweitägiger Zellkultur war der Mittelwert der CAT Aktivitäten der transient c-fos-transfizierten Zellen mit 6797 ± 861 cpm von dem Kontrollwert mit 6825 ± 1427 cpm/15 µg Protein nach einstündiger Reaktion praktisch unverändert.

Transfektion c-fos transgener osteogener Zellen mit pAkv CAT

Zunächst wurden c-fos transgene ROS 17/2.8 Zellen hergestellt. Dazu wurde die ROS 17/2.8 Zelllinie mit dem c-fos

Expressionsvektor p76/21 transfiziert. Der genannte Vektor beinhaltet neben c-fos das Neomycin-Resistenzgen. Parallel dazu wurde dieselbe Zelllinie mit dem pSV2 neo Vektor stabil transfiziert. Diese Zellen sollten als nicht c-fos-transgene Kontrolle dienen. In beiden Fällen entstanden ca. 300 G 418 resistente Kolonien, als Zellpools weiterkultiviert wurden. Die stabil transfizierten Zellen bekamen die Bezeichnung 17-fos bzw. 17-neo. Zum Nachweis der Expression des neueigeführten c-fos wurde ein Northern Blot der RNS dieser Zellen mit einer fos spezifischen DNS Sonde (dem 1 kb großen Pst I Fragment von p-fos-1, Curran et al., 1982) hybridisiert.

Auf der Autoradiographie der Northern Blot Hybridisierung (Abb.10) ist zu erkennen, daß bei der c-fos transfizierten Zelllinie eine zusätzliche Bande von 3,0 kb auftritt. Diese Größe entspricht der Länge der c-fos m-RNS (Rüther et al. 1985).

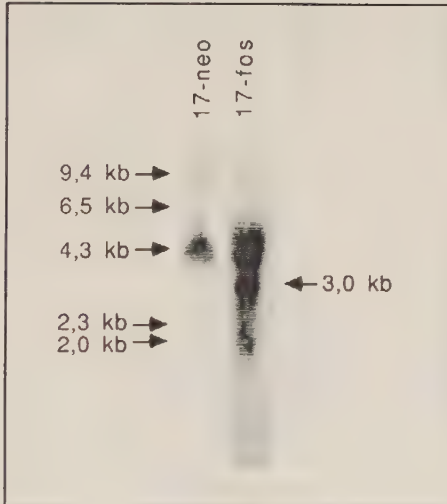


Abb.10:

Nachweis der Expression der exogenen c-fos
m-RNA durch Northern Blot Hybridisierung.

Nachdem damit nachgewiesen war, daß die 17-fos Zellen das exogene c-fos exprimierten, konnte der Effekt der konstitutiven c-fos Expression auf die Akv-LTR untersucht werden. Die 17-fos Zellen wurden mit pAkv CAT transfiziert, als Kontrolle dienten die 17-neo Zellen. Für den Fall unterschiedlicher CAT Aktivitäten in 17-fos und 17-neo mußte festgestellt werden, ob das c-fos Onkogen virale Promoter unspezifisch aktivierte. Dazu wurden die gleichen Zellen mit pSV2 CAT transfiziert.

Die Transfektion von 17-fos Zellen mit pAkv CAT resultierte in einer um 50% geringeren CAT Aktivität als die Transfektion von 17-neo Zellen mit dem selben Plasmid. Die CAT Aktivität des SV2 Promoters war um 28% erhöht. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

Die Kotransfektion der Plasmide des pAkv CAT Reportergens und des c-fos Onkogens in ausgeglichenen Konzentrationen hatte keine Veränderung der CAT Aktivität gegenüber der Kontrolle ohne c-fos zur Folge. Dasselbe trifft für die Transfektion von Zellen, die das Reporterplasmid im Genom enthalten, mit dem c-fos Expressionsvektor zu. C-fos transgene Zellen zeigen nach Transfektion mit pAkv CAT im Vergleich zu nicht c-fos transgenen Zellen eine deutliche Abnahme der LTR Aktivität. Eine Wirkung des c-fos Onkogens auf die LTR-Aktivität von Akv MuLV, nämlich eine Repression der Transkription konnte also unter den beschriebenen Bedingungen nur bei einem Überschuß an c-fos festgestellt werden.

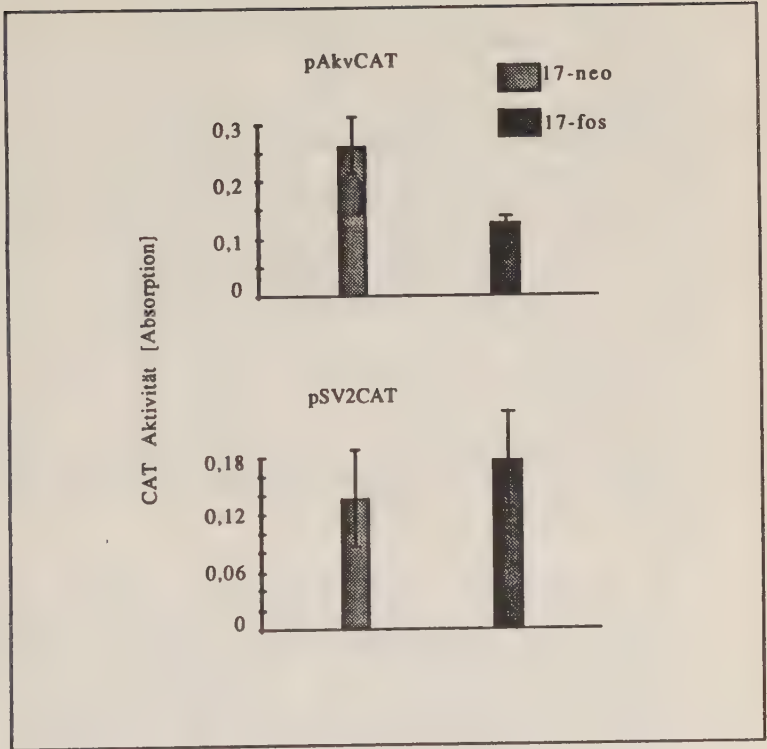


Abb.11:
Transfektion c-fos transgener osteogener Zellen mit pAkv
CAT

E. Diskussion

Die Retrovirusisolate Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV erzeugen in Mäusen Osteome und Osteopetrose, sowie Lymphome (Luz et al., Murray et al., im Druck). Diese primär gutartigen Knochenveränderungen treten nach einer Infektion mit dem RFB MuLV mit der höchsten Inzidenz und nach der kürzesten Latenzzeit auf; das Akv MuLV dagegen ist das am wenigsten virulente der drei Isolate. Der Strukturvergleich ihrer LTRs zeigt einen hohen Verwandtschaftsgrad, nur im Enhancerbereich der U3 Region liegen auffällige Unterschiede vor: Mehrere Segmente sind rearrangiert (siehe Abb.12). Die Enhancerregion im U3 Abschnitt der LTR des viralen Genoms hat die Funktion, die Rate der Virustranskription zu steuern. Die vorliegende Arbeit ging von der Hypothese aus, daß in der Regulation der Virustranskription ein Schlüssel zur Pathogenität der genannten Virusisolate liegt.

Für die Steuerung der Virustranskription sind DNS Sequenzen (sogenannte "responsive elements") in der Enhancerregion verantwortlich, die spezifische Regulationsproteine binden und damit eine Aktivierung oder Repression der Transkription bewirken. Solche Regulationsproteine sind beispielsweise zell-spezifische Faktoren, darunter auch solche, die für einen bestimmten zellulären Differenzierungszustand charakteristisch sind. Rezeptoren für Steroidhormone werden über den gleichen Mechanismus der DNS-Bindung wirksam. Auch die nukleären Onkogene regulieren durch DNS-Bindung die Transkription. Für diese Arbeit wurde aus jedem dieser drei Bereiche (Differenzierung, Hormone, Onkogene) ein Modellsystem gewählt, das für die Pathogenese Retrovirus-induzierter Knochentumoren relevant erschien.

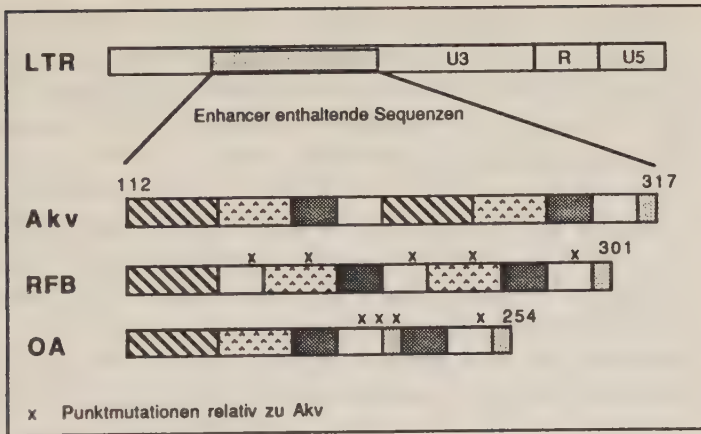


Abb.12.:

Aufbau der Enhancerbereiche von Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV (nach Behnisch, 1988).

Zur genaueren Untersuchung der Regulation der Virustranskription wurde das CAT-Reportergen gewählt. Dieses wurde nach Rekombination mit der U3 LTR der verschiedenen Viren in Zellen transfiziert. Die relativ einfach zu bestimmende CAT-Expression ist ein Maß für die jeweilige LTR Aktivität (Gorman et al., 1982).

Zunächst sollte geklärt werden, ob der Differenzierungszustand einer Knochenzelle einen Einfluß auf die Transkription der knochenpathogenen Retrovirusisolate Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV ausübt. Als Modell für die knochenspezifische Differenzierung wurde die ROS 17/2.8 Zelle (Majeska et al., 1980) aufgrund ihrer Fähigkeit zur Differenzierung in vitro gewählt. Als Maß für den Grad der osteogenen Differenzierung diente die Expression des Enzyms Alkalische Phosphatase (ALP). Die osteogene Differenzierung läuft hier spontan mit

zunehmender Zelldichte ab. Durch Zugabe von TGF- β wird die Expression des für Osteoblasten typischen Enzyms ALP noch gesteigert (Noda und Rodan, 1987). Die Behandlung der Zellen mit Retinolsäure verhindert eine weitere osteogene Differenzierung (Imai et al., 1987).

Es sollten Faktoren gemessen werden, die von der Wirtszelle während eines bestimmten Differenzierungszustandes exprimiert werden und die die virale Transkription beeinflussen können. Bei der Zugabe der differenzierungsmodulierenden Substanzen TGF- β und Retinolsäure mußte jedoch ausgeschlossen werden, daß diese ihrerseits die virale Transkription durch einen unmittelbaren Einfluß auf die LTR verändern. Aus diesem Grund wurden ROS 17/2.8 Zellen mit pRFB-CAT (dem rekombinanten Plasmid aus RFB LTR und CAT Reportergen) transfiziert und für 24 h mit TGF- β und Retinolsäure behandelt. In diesem Zeitraum verändert sich der Differenzierungszustand nur unwesentlich. Die TGF- β Behandlung bewirkte keine Veränderung der CAT Aktivität; die Retinolsäurebehandlung resultierte jedoch in einer deutlichen Erhöhung der CAT Aktivität. Retinolsäure konnte aus diesem Grund in den weiteren geplanten Versuchen nicht eingesetzt werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Messung des Verlaufs der CAT Aktivität über mehrere Tage hinweg war die stabile Transfektion der Zellen, da bei einer transienten Transfektion die Plasmidkonzentration pro Zelle im Laufe der Zellteilungen abnimmt. Bei der stabilen Transfektion werden die Plasmide in die chromosomale DNS integriert. Dies wurde durch Kotransfektion mit dem Gen für die Neomycinresistenz (neo) und anschließende Selektion mit dem Neomycinanalog G418 erreicht. Dieses Vorgehen hat den Nachteil, daß durch die Rekombination der transfizierten DNS mit der genomischen DNS beide eine Veränderung erfahren. Die Ringstruktur der

ersteren wird an einer nicht vorhersagbaren Stelle geöffnet, also theoretisch auch in der relevanten Sequenz; letztere wird an der Stelle der Insertion aufgetrennt. Für das Plasmid kann das bedeuten, daß entweder das Reportergen zerstört wird (mit der Folge, daß kein Signal entstehen kann), oder daß die Regulationssequenzen verändert werden. Durch den Integrationsvorgang in die genomische DNS könnte eine Störung zellulärer Funktionen daraus resultieren, daß durch die Plasmidinsertion entweder ein wichtiges Gen zerstört wird, oder durch den neu hinzugekommenen Promotorbereich fehlreguliert wird. Diesen Einwänden wurde dadurch Rechnung getragen, daß in den Experimenten jeweils die gesamte Population der erfolgreich transfizierten Zellen eingesetzt wurde, die Zellen also nicht nach einem bestimmten Integrationsort selektioniert wurden. Dadurch können solche möglichen Artefakte kaum zur Wirkung kommen.

Die Southern Blot Hybridisierung der DNS aus den stabil transfizierten Zellen mit einer CAT-spezifischen DNS-Sonde ergab jeweils eine einzige Bande von der Größe des Bam H I Fragments aus den LTR CAT Plasmiden. Das bedeutet, daß das CAT-Gen in allen Fällen intakt geblieben ist. Die Northern Blot Hybridisierung der entsprechenden RNS Präparationen mit der selben DNS-Sonde zeigt Signale bei einer einheitlichen Molekülgröße von 2,4 kb, das entspricht der Größe der CAT mRNA. Die stabile Transfektion war also erfolgreich, das CAT Gen wurde in den stabil transfizierten ROS 17/2.8 Zellen korrekt transkribiert. Damit konnten die Experimente zum Einfluß der Knochenzelldifferenzierung auf die LTR Aktivität durchgeführt werden.

Nach der Transfektion und anschließender G418-Selektion waren die Zellen noch zur osteogenen Differenzierung in vitro fähig: Die ALP Aktivität stieg mit zunehmender Kulturdauer, und konnte durch TGF- β Behandlung darüberhinaus noch

verstärkt werden. Die LTR-Aktivität in den unterschiedlich stark differenzierten Zellen blieb dagegen auf einem konstanten Niveau. Aus diesen Experimenten ist zu schließen, daß in ROS 17/2.8 Zellen meßbare Veränderungen des Differenzierungsgrades keinen Einfluß auf die Virusexpression der untersuchten MuLVs haben. Dieses Ergebnis kann folgendermaßen zu interpretiert werden: Sobald die Knochenzelle einen gewissen Differenzierungsgrad erreicht hat, bleibt eine weitere Erhöhung desselben ohne Einfluß auf die Transkriptionsrate der hier untersuchten knochenpathogenen Retroviren. Dieses Ergebnis ergänzt den bisherigen Wissensstand, nach dem undifferenzierte Stammzellen die Expression von retroviralen Genomen blockieren, und dieser Block bei beginnender Differenzierung durch eine Veränderung des Musters DNS-bindender Regulationsproteine aufgehoben wird (Jaenisch et al., 1975; Gorman et al., 1985; Hilberg et al., 1987).

Auch der Glukokortikoid-Rezeptor ist ein DNS-bindendes Protein (Yamamoto, 1985). Die korrespondierende DNS Sequenz, das Glukokortikoid-responsive Element (GRE) ist in vielen viralen und zellulären Enhancern vorhanden (Geisse et al., 1982; Karin et al., 1984; Jantzen et al., 1987) und bewirkt eine erhöhte Genexpression, wenn der Komplex aus Glukokortikoid und Rezeptor an die DNS-Sequenz bindet. Die LTRs von Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV enthalten GREs (Celander und Haseltine 1988; Behnisch 1988; siehe Abb. F.1., offene Flächen). Retinolsäure wirkt ebenfalls über einen Rezeptor (Petkovic et al., 1987). Über die Existenz eines Retinolsäure-"responsive element" auf den genannten LTRs ist zwar noch nichts bekannt, jedoch hatten vorausgegangene Experimente gezeigt, daß Retinolsäure diese LTRs aktiviert.

Es wurde daher untersucht, inwieweit sich die Transkriptionsaktivitäten der LTRs von Akv MuLV, RFB MuLV

und OA MuLV durch Behandlung mit Dexamethason und Retinolsäure beeinflussen lassen. Üblicherweise werden derartige Versuche mittels transienter Transfektion durchgeführt, was jedoch den Nachteil in sich birgt, daß von Ansatz zu Ansatz die Transfektionseffizienz abweichen kann. Daher wurde wiederum das System der stabil transfizierten Zellen gewählt. Als weitere Kontrolle neben dem SV2 Promotor in pSV2-CAT (negative Kontrolle) wurde die LTR des Mäuse-Brustkrebs-Virus in pMMTV-CAT eingesetzt. Die MMTV LTR ist bei einer sehr geringen Basis-LTR-Aktivität durch Glukokortikoide sehr effektiv induzierbar (Ringold et al., 1977). Zwar üben sowohl Dexamethason (Schmidt et al., 1987) als auch Retinolsäure (Imai et al., 1987) in der ROS 17/2.8 Zelle im Verlauf einer mehrtägigen Zellkultur einen Einfluß auf die Expression von Osteoblastenmarkern aus, jedoch ist dieser Effekt innerhalb von 24h vernachlässigbar gering.

Bei den drei untersuchten LTRs resultierte die Behandlung der Zellen sowohl mit Dexamethason als auch mit Retinolsäure in einer Erhöhung der CAT Aktivitäten im Vergleich zur den unbehandelten Kontrollen, die gleichzeitige Zugabe beider Substanzen ergab eine weitere Erhöhung gegenüber den einzelnen Substanzen. Da die Erhöhung des Signals nach Behandlung mit beiden Substanzen etwa der Summe der Einzelwirkungen entsprach, kann auf einen additiven Effekt geschlossen werden. In der Kontrolle mit MMTV-LTR ließ sich eine erwartungsgemäß erheblich stärkere Stimulation der LTR durch Dexamethason, nicht aber durch Retinolsäure erreichen. Dies bedeutet, daß beide Substanzen unabhängig voneinander in der Lage sind, die Transkription von Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV zu stimulieren. Die bereits vorher beschriebene Induzierbarkeit der LTRs dieser Viren durch Glukokortikoide (Celandier und Haseltine 1988; Behnisch 1988) konnte also bestätigt werden. Eine Induzierbarkeit von Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV durch Retinolsäure ist bisher noch nicht

beschrieben worden, und über die Anwesenheit von einem "Retinolsäure responsive element" in diesen LTRs ist nichts bekannt. Neueste Untersuchungen von Umesuno et al., (1988) zeigten, daß ein in vitro translatierter menschlicher Retinolsäure Rezeptor mit hoher Affinität an das "responsive element" für das Schilddrüsenhormon T₃ (TRE: 5'-TCAGGTCA·TGACCTGA-3', Glass et al., 1988) bindet und daß das TRE in Verbindung mit Retinolsäure die Transkription eines daran gekoppelten Reportergens verstärkt. Der Homologievergleich der Akv LTR mit dieser Sequenz erbrachte jedoch keinerlei Ähnlichkeit. Dies ist um so erstaunlicher, als bisher für derartige "responsive elements" in verschiedenen Genen auch über Speziesgrenzen hinweg immer Ähnlichkeiten gefunden werden konnten. Dies könnte bedeuten, daß in diesem Fall ein weiteres, noch unbekanntes "responsive element" existiert. Eine andere Erklärung für diesen Befund wäre, daß der Retinolsäure-Retinolsäurerezeptor-Komplex gar nicht direkt an die DNS bindet, sondern ein oder mehrere verschiedene Gene aktiviert, die ihrerseits an den Enhancer binden. Diesen Schluß zieht Collins für die MoMuLV LTR, die in der hämatopoetischen KG-1 Zelle durch Retinolsäure induzierbar ist (Collins, 1988). Allerdings ist diese Induktion erst nach 3 Tagen sichtbar, und nicht, wie hier gezeigt, bereits nach 24 Stunden.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Retinolsäure-Induzierbarkeit und der Pathogenität im Knochengewebe dieser Viren liegt in der morphogenen Eigenschaft der Retinolsäure bei der Ausbildung des Skeletts. Die Applikation von Retinolsäure an der Gliedmaßenanlage des Hühnerembryos bewirkt eine Verdopplung der Gliedmaße (Tickle et al., 1982). Thaller und Eichele (1988) demonstrierten die Anwesenheit eines Retinolsäuregradienten entlang einer Achse, die der Anlage der einzelnen Finger entspricht. Ein reziprok dazu verlaufender Gradient wurde für das Bindungsprotein der Retinolsäure nachgewiesen, während der Retinolsäurerezeptor

in der ganzen Gliedmaßenanlage in gleichmäßiger Konzentration vorliegt (Maden et al., 1988). Unter der Voraussetzung, daß diese Verhältnisse auf neugeborene Mäuse übertragen werden können, deckt sich die Modellvorstellung, daß knochenpathogene MuLVs an Orten erhöhter Retinolsäurekonzentration verstärkt aktiviert werden, mit dem bevorzugten Auftreten von Knochentumoren in den langen Röhrenknochen der Maus.

Es ist aber auch möglich, daß die Glukokortikoid- und Retinolsäure- "responsive elements" für die Entstehung von Knochentumoren keine direkte Bedeutung haben, dem Virus aber in anderen Zellen Selektionsvorteile bringen, was die Wahrscheinlichkeit, ihr pathogenes Potential entfalten zu können, erhöht. Eine Funktion für GREs und andere "responsive elements" muß allein deshalb postuliert werden, weil Viren aus Selektionsgründen generell kein redundantes genetisches Material über längere Zeit konservieren können.

Eine weitere Gruppe von DNS-bindenden Regulationsproteinen bilden die nukleären Onkogene. Von diesen hat das fos Onkogen eine besondere Bedeutung im Knochensystem: Das v-fos ist in den Genomen des FBJ murinen Sarkomvirus (FBJ MuSV) und FBR MuSV enthalten (Curran et al., 1982; van Beveren et al., 1984; Michiels et al., 1984). Beide Viren wurden aus primären Knochentumoren isoliert (Finkel et al., 1966; Finkel et al., 1973) und erzeugen selbst wieder nach kurzer Latenzzeit Knochentumoren, z.B. Osteosarkome (Finkel et al., 1973; Michiels et al., 1984; Erfle et al., 1985). Auch das Auftreten von malignen Knochentumoren bei c-fos transgenen Mäusen (Rüther et al., 1987; Rüther et al., Manuskript eingereicht) weisen auf eine besondere Rolle des c-fos Gens im Knochengewebe hin. Es wurde daher untersucht, ob die konstitutive Expression von c-fos einen Einfluß auf die LTR-Aktivität des knochenpathogen murinen Akv MuLV hat.

Zur Untersuchung einer möglichen Aktivierung des Akv MuLV LTR durch das Genprodukt des c-fos Onkogens wurden zunächst drei Strategien versucht: a) die Kotransfektion der osteogenen ROS 17/2.8 Zelle mit dem Reporterplasmid pAkv CAT und dem fos Expressionsvektor p76/21, b) die transiente Transfektion einer stabil fos exprimierenden Zelle mit dem Reporterplasmid, sowie c) die transiente Transfektion einer stabil das Reporterplasmid exprimierenden Zelle mit dem fos Expressionsvektor. Nur im Fall c) war im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Unterschied in der Expression des Reportergens festzustellen: Die CAT Aktivität der fos exprimierenden Zellen war im Vergleich zur Kontrolle um die Hälfte erniedrigt. Dabei handelt sich es nicht um einen allgemeinen, die Transkription hemmenden Effekt, wie der Vergleich mit dem Kontrollplasmid pSV2 CAT zeigt, bei dem keine signifikante Veränderung zu beobachten ist. Die Tatsache, daß die beiden zuerst beschriebenen Versuchsansätze keinen Effekt des fos Onkogenprodukts aufzeigten, kann mit dem relativ zur Kopienzahl des Reporterplasmids niedrigen Verhältnis der fos Expression erklärt werden.

Eine negative Regulation der Transkription durch fos wurde neben den Promotoren des AP-2 Gens in Adipozyten (Distel et al., 1987) und des c-fos Gens selbst (Sassone-Corsi et al., 1988b) auch für die LTRs des menschlichen Immunschwäche Virus HIV und des Gibbon Ape Leukemia Virus beschrieben (Franza et al., 1988). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Setoyama et al., (1986), der für die LTR des Rous Sarkomvirus (RSV) eine Aktivierung durch fos beschreibt. Die Sequenz, die von Setoyama als für die fos Aktivierung entscheidend vorgeschlagen wurde (5'-ACAGACA-3'), weicht in einer Base von der ähnlichsten Sequenz in der Akv LTR ab (5'-ACAGAGA-3').

Es ist aber auch möglich, daß die Wirkung des fos-Produktes auf die LTR von deren molarem Verhältnis zueinander abhängt, beispielsweise ein hoher Überschuß an Fos eine Repression, ein anderes Verhältnis aber eine Aktivierung bewirkt. Ein derartiges Phänomen wurde bereits von Herrlich (persönliche Mitteilung) diskutiert. Weitere Experimente mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen der Plasmide müssen diese Frage klären. Die Bestätigung einer LTR Aktivierung durch das fos Onkogenprodukt könnte einen wesentlichen Beitrag zur Klärung der Rolle des fos Onkogens in der Entstehung von Knochentumoren leisten.

F. Zusammenfassung

Die C-Typ Retroviren Akv MuLV, RFB MuLV und OA MuLV erzeugen nach Infektion neugeborener Mäuse Osteopetrose und Osteome. Diese Viren sind sehr nahe miteinander verwandt, unterscheiden sich aber biologisch in ihrer Virulenz und strukturell im Enhancerbereich ihrer LTRs. Der Enhancerbereich steuert die Virustranskription durch die Bindung spezifischer im Zellkern anwesender Proteine.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Faktoren in differenzierenden Knochenzellen die Transkription dieser knochenpathogenen Viren aktivieren. Dabei konnte gezeigt werden, daß die mit fortgeschrittener osteogener Differenzierung einhergehende veränderte Expression DNS-bindender Proteine ohne Einfluß auf die LTR-Aktivität bleibt.

Die DNS-bindenden aktivierten Hormonrezeptoren von Dexamethason und Retinolsäure dagegen verursachen, unabhängig voneinander und additiv, eine deutliche Steigerung der LTR-Aktivität. Auch das nukleäre, durch DNS-Bindung wirksame Genprodukt des fos-Onkogens beeinflußt die Transkriptionsrate dieser Viren: Hier wurde eine Absenkung der Transkriptionsrate gemessen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die Fos- Bindung an die viralen LTRs in anderen Konzentrationen möglicherweise eine verstärkte Virusexpression verursacht.

Summary:**ON THE TRANSCRIPTION OF BONE-PATHOGENIC RETROVIRUSES IN SKELETAL CELL CULTURES**

After infection of newborn mice, the endogenous C-type retroviruses Akv MuLV, RFB Osteomavirus and OA MuLV cause lymphomas together with osteopetrosis and osteomas. These viruses are very closely related, differing, however, biologically in their virulence and structurally within the enhancer regions of their LTRs. The role of the enhancer region consists of the regulation of viral transcription by specific binding of nuclear proteins. It was investigated, whether there are DNA-binding proteins in bone cells which are capable to activate transcription of bone tumor-inducing viruses. It was demonstrated, that the expression of differentiation-specific DNA-binding proteins does not result in an altered LTR activity.

In contrast, the activated receptors for glucocorticoid hormone and for retinoic acid do induce LTR activity, independently and in an additive manner. The nuclear fos oncogene, which codes for a protein acting by DNA-binding, also has an influence on the transcription of these viruses: Under the conditions used, a reduction of LTR activity was shown. Further investigations will have to reveal, whether different relative concentrations of Fos and LTR result in an activation of virus expression.

G. Literaturverzeichnis

- Ahmad, N., Merbis, R.J., Venkatesan, S., 1988: The B (3')-orf product of the human immunodeficiency virus (HIV) suppresses transcription from HIV LTR containing the negative regulatory element (NRE). IV. International Conference on AIDS, Stockholm, June 1988 (abstract 1525).
- Behnisch, W. 1988: Molekulare Klonierung und Charakterisierung der murinen osteotropen Leukämieviren RFB und OS-5. In: Wissenschaftliche Forschungsbeiträge Biologie/Biochemie/Chemie Band 17. Hrsg. Intemann.
- Bradford, M.M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brulet, P., Kaghad, M., Yi-Sheng Xu, Croissant, O., Jacob, F., 1983: Early differential tissue expression of transposon-like repetitive DNA sequences of the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5641-5645.
- Celander, D., Haseltine, W. A., 1984: Tissue-specific transcription preference as a determinant of cell tropism and leukemogenic potential of murine retroviruses. Nature 312, 159-162.
- Celander, D., Hsu, B.L., Haseltine, W. A., 1988: Regulatory Elements within the Murine Leukemia Virus Enhancer Regions Mediate Glucocorticoid Responsiveness. J. Virology 62, 1314-1322.

- Cerny, J., Essex, M., 1978: Naturally Occurring Biological Immunosuppressive Factors (Neubener, R., ed.), CRC Press, Inc., Cleveland.
- Chatis, P. A., Holland, C. A., Hartley, H. W., Rowe, W. P., Hopkins, N., 1983: Role for the 3' end of the genome in determining disease specificity of Friend and Moloney murine leukemia viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4408-4411.
- Chiu, R., Boyle, W.J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T., Karin, M., 1988: The c-Fos Protein Interacts with c-Jun/AP-1 to Stimulate Transcription of AP-1 Responsive Genes. *Cell*, 54, 541-552.
- Collins, S. J., 1988: Retinoic Acid-Induced Differentiation of Retrovirus-Infected HL-60 Cells Is Associated with Enhanced Transcription from the Viral Long Terminal Repeat. *J. Virology*, 62, 4349-4352.
- Curran, T., Peters, G., van Beveren, C., Teich, N., Verma, I. M., 1982: FBJ Murine Sarcoma Virus: Identification and Molecular Cloning of Biologically Active Proviral DNA. *J. Virology*, 44, 674-682.
- DesGrosseillers, L., Jolicœur, P., 1984: The tandem direct repeats within the long terminal repeat of murine leukemia viruses are the primary determinant of their leukemogenic potential. *J. Virology*. 52, 945-952.
- Distel, R.J., Ro, H.-S., Rosen, B.S., Groves, D.L., Spiegelman, B.M., 1987: Nucleoprotein Complexes That Regulate Gene Expression in Adipocyte Differentiation: Direct Participation of c-fos. *Cell* 49, 835-844.

- Erfle, V., Schmidt, J., Leib-Mösch, C., Pedersen, F.S., Luz, A., 1985: Einfluß der Genomstruktur von Retroviren auf die Entwicklung von Knochentumoren. In: Bericht des Kongresses der Deutschen Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Giessen. DVG, ISSN 0417-268x, pp.118-126.
- Finkel, M.P., Biskis, B.O., Jenkins, P.B., 1966: Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science*, 151, 698-701.
- Finkel, M.P., Reilly, C.A., Biskis, B.O., Greco, J.L., 1973: Bone tumor viruses. In: Bone-Certain aspects of neoplasia. Colston Papers No. 24 (Price, Ross, eds.), Butterworth, London.
- Franza, R.B., Jr., Rauscher, F.J. III, Josephs, S.F., Curran, T., 1988: The fos simplex and fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science*, 239, 1150-1153.
- Garcia, J.A., Wu, F.K., Mitsuyasu, R., Gaynor, J.B., 1987: Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J.* 6, 3761-3770.
- Geisse, S., Scheidereit, C., Westphal, H.M., Hynes, N.E., Groner, B., Beato, M., 1982: Glucocorticoid receptors recognize DNA sequences in and around murine mammary tumor virus DNA. *EMBO J.* 1, 1613-1619.
- Glass, C. K., Holloway, J. M., Devary, O. V., Rosenfeld, M. G., 1988: The Thyroid Hormone Receptor Binds with Opposite Transcriptional Effects to a Common Sequence Motif in Thyroid Hormone and Estrogen Response Elements. *Cell*, 54, 313-323.

- Gorman, C.M., Moffat, L., Howard, B.H., 1982: Recombinant genomes which express Chloramphenicol Acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2,1044-1051.
- Gorman, C.M., Rigby, P.W.J., Lane, D.P., 1985: Negative Regulation of viral enhancers in undifferentiated embryonic stem cells. *Cell* 42, 519-526.
- Greß, M., Ziegler, M., Ostertag, 1988: Host cell control of viral activity: Identification of cellular factors that mediate the repression of the Mo-MuLV in mouse embryonal carcinoma cells. Vortrag auf dem Joint Meeting of the Sektion Virologie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie and the Virus Group of the Society for General Microbiology.
- Günzburg, W. H., Salmons, B., 1986: Mouse Mammary Tumor Virus Mediated Transfer and Expression of Neomycin Resistance to Infected Cultured Cells. *Virology* 155, 236-248.
- Hilberg, F., Stocking, C., Ostertag, W., Greß, M., 1987: Functional analysis of a retroviral host-range mutant: Altered long terminal repeat sequences allow expression in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5232-5236.
- Imai, Y., Rodan, S.B., Rodan, G.A., 1987: Effects of Retinoic Acid on Alkaline Phosphatase Messenger Ribonucleic Acid, Catecholamine Receptors, and G Proteins in ROS 17/2.8 Cells. *Endocrinology*, 122, 456.
- Jaenisch, R., Fan, H., Croker, B., 1975: Infection of preimplantation mouse embryos and of new born mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA leukemogenesis in the adult animal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 4008-4012.

- Jantzen, H.-M., Strähle, U., Gloss, B., Steward, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicek, R., Schütz, G., 1987: Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 49, 29-38.
- Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Luciw, P.A., Tjian, R., 1986: Activation of AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* 232, 755-759.
- Jones, K.A., Luciw, P.A., Ducheane, N., 1988: Structural arrangements of transcription control domains within the 5' untranslated leader regions of the HIV-1 and HIV-2 promoters. *Genes Development* 2, 1101-1114.
- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R.I., Krauter, P., Westphal, H. M., Beato, M., 1984: Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormone induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 308, 513-519.
- Kaufman, J.D., Valandra, G., Roderiquez, G., Bushar, G., Giri, C., Norcross, M.A., 1987: Phorbol ester enhances human immunodeficiency virus-promoted gene expression and acts on a repeated 10-base-pair functional enhancer element. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 3759-3766.
- Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., Ryffel, F.U., 1986: And estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* 46, 1053-1061.
- Leib-Mösch, C., Schmidt, J., Etzerodt, M., Pedersen, F. S., Hehlmann, R., Erfle, V., 1986: Oncogenic Retrovirus from Spontaneous Murine Osteomas II. *Molecular Cloning and Genomic Characterization. Virology*, 150, 96-105.

- Lenz, J., Celander, D., Crowther, R. L., Patarca, R., Perkins, D. W., Haseltine, W.A., 1984: Determination of the leukemogenicity of a murine retrovirus by sequences within the long terminal repeat. *Nature* 308, 467-470.
- Lowy, D.R., Rands, E., Chattopadhyay, S.K., Garon, S.K., Hager, G.L., 1980: Molecular cloning of infectious integrated murine leukemia virus DNA from infected mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 614-618.
- Luz, A., Murray, B., Schmidt, J., im Druck: Osteoma mouse, spontaneous and virus-induced. In: ILSI Monographs On Pathology Of Laboratory Animals, Musculoskeletal System. Jones, Mohr, Hunt (eds.), Springer Verlag.
- Maden, M., Ong, D. E., Summerbell, D., Chytil, F., 1988: Spatial distribution of cellular protein binding to retinoic acid in the chick limb bud. *Nature* 335, 733-735.
- Majeska, R.J., Rodan, S.B., Rodan, G.A., 1980: Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. *Endocrinology* 107, 1494-1503.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., 1982: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Michiels, L., Maisin, J.R., Pedersen, F.S., Merregaert, J., 1984: Characterization of the FBR-murine osteosarcoma virus complex: FBR-MuSV encodes a fos-derived oncogene. *Int. J. Cancer* 33, 511-517.

- Morrison, D.A. 1979: Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing. *Meth. Enzymol.* 68, 326-331.
- Murray, B., Schmidt, J., Luz, A., im Druck: Osteopetrosis induced by retrovirus, mouse. In: *ILSI Monographs On Pathology Of Laboratory Animals, Musculoskeletal System*. Jones, Mohr, Hunt (eds.), Springer Verlag.
- Neumann, J. R., Morency, C. A., Russian, K. O., 1987: A Novel Rapid Assay for Chloramphenicol Acetyltransferase Gene Expression. *BioTechniques* 5, 444-447.
- Noda, M. und Rodan, G.A., 1987: Type b Transforming Growth Factor (TGF-b) Regulation of Alkaline Phosphatase Expression and Other Phenotype-Related mRNA in Osteoblastic Rat Osteosarcoma Cells. *J. Cell. Physiology*, 133, 426-437.
- Parkhurst, S. M., Corces, V. G., 1987: Developmental expression of *Drosophila melanogaster* retrovirus-like transposable elements. *EMBO J.* 6, 419-424.
- Petkovic, M., Brand, N.J., Krust, A., Chambon, P., 1987: A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450.
- Ratner, L., und Niederman, T., 1988: Analysis of the function of the HIV-1 R and 3' orf gene products. IV. International Conference on AIDS, Stockholm, June 1988 (abstract 1014).
- Ringold, M.R., Yamamoto, K.R., Bishop, J.M., Varmus, H.E., 1977: Glucocorticoid-stimulated accumulation of mouse mammary tumor virus RNA: Increased rate of synthesis of viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2879-2883.

- Rodan, G.A., Rodan, S.B., 1984: Expression of the osteoblastic phenotype. In: Peck W.A: (ed.), *Advances in Bone and Mineral Research. Annual II. Excerpta Medica, Amsterdam*, pp.244-285.
- Rosen, C.A., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., 1985: The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell*, 44, 941-947.
- Rosen, C.A., Terwilliger, E.F., Dayton, A.I., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., 1988: Intragenic cis-acting art gene responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2071-2075.
- Rüther, U., Garber, C., Komitiowski, D., Müller, R., Wagner, E.F., 1987: Deregulated c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature* 325, 412-416.
- Rüther, U., Wagner, E. F., Müller, R., 1985: Analysis of the differentiation-promoting potential of inducible c-fos genes introduced into embryonal carcinoma cells. *EMBO Journal*, 4, 1775-1781.
- Sassone-Corsi, P., Lamph, W.W., Kamps, M., Verma, I.M., 1988a: fos-Associated Cellular p39 Is Related to Nuclear Transcription Factor AP-1. *Cell*, 54, 553-560.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J.C., Verma, I.M., 1988b: Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* 334, 314-319.

- Schmidt, J., Casser-Bette, M., Rodan, G.A., Baumgartner-Decker, C., Erfle, V., 1987: Bone tumor-inducing retroviruses and osteoblastic cells in vitro: target cell specificity and effects of viral infection. In: Current Advances in Skeletogenesis/3. S. Hurwitz and J. Sela (eds.) pp. 73-91. Plenum Press, New York.
- Schmidt, J., Erfle, V., Pedersen, F. S., Rohmer, H., Schetters, H., Marquart, K.-H., Luz, A., 1984: Oncogenic Retrovirus from Spontaneous Osteomas. I. Isolation and Biological Characterization. *J. Gen. Virology* 65, 2237-2248.
- Setoyama, C., Frunzio, R., Liau, G., Mudryj, M., de Combrughe, B., 1986: Transcriptional activation encoded by the v-fos gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3213-3217.
- Shaw, J.P., Utz, P.J., Durand, D.B., Toole, J.J., Emmer, E.A., Crabtree, D.R., 1988: Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* , 241, 202-205.
- Snyderman, R., Cianciolo, G. C., 1984: Immunosuppressive activity of the retroviral envelope protein P15E and its possible relationship to neoplasia. *Immunology Today*, 5, 240-244.
- Southern, E. M., 1975: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Speck, N.A., Baltimore, D, 1987: Six distinct nuclear factors interact with the 75-base pair repeat of the Moloney murine leukemia virus enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1101-1110.

- Thaller, C., Eichele, G., 1988: Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 327, 553-554.
- Thomas, P. S., 1980: Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201.
- Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L., Lee, J., 1982: Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* 296, 564-566.
- Umesuno, K., Giguere, V., Glass, K., Rosenfeld, M. G., Evans, R. M., 1988: Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* 336, 262-265.
- Vieira, J., Messing, J., 1982: The pUC plasmid, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268.
- Van Beveren, C., Enami, S., Curran, T., Verma, I.M., 1984: FBR murine osteosarcoma virus II. Nucleotide sequence of the provirus reveals that the genome contains sequence acquired from two cellular genes. *Virology* 135, 229-243.
- Wigler, M., Pellicer, S., Axel, R., 1978: Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 14, 725-731.
- Winberg, G., Hammar-skjold, M.-L., 1979: Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA. *Nucl. Acid Res.* 8, 253-264.

- Yamamoto, K.R. 1985: Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genetics* 19, 209-252.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr danke ich vielmals für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Herrn Prof. Dr. Volker Erfle danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme in der Abteilung für Molekulare Zellpathologie der GSF sowie für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seinem Labor.

Den Herren Dr. Günter Strauß und Dr. Jörg Schmidt danke ich vielmals für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und Frau Dr. Constanze Friemert für die wertvollen Anregungen bei der Erstellung des Manuskripts.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Werner Behnisch, der mir die Fertigkeit der DNS-Transfektionstechnik sowie des CAT-Assays vermittelte, und dessen Vorarbeit letztlich die Grundlage für diese Arbeit waren.

Frau Christine Baumgartner-Decker und Herrn Robert Baier danke ich für die Unterweisung und die mir oft gewährte Hilfe beim Erlernen der Methoden der Zellkultur bzw. der Molekularbiologie.

Dem Goddeng'schen Labor danke ich für die Ausführung der Photoarbeiten.

Ich bedanke mich bei den Damen aus der Spülküche sowie des Sekretariats für ihren Einsatz und allen nicht genannten Kolleginnen und Kollegen für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die stets herrschte.

Lebenslauf

geboren am 24.11.1957 in Mainz

Familienstand: verheiratet mit Barbara Kittelberger-Berthold,
Dipl. Wi.-Ing.

Vater : Fritz Berthold, Dr. rer.nat., Dipl. Physiker

Mutter: Hanne-Lore Berthold, Kantorin

Dez. 64 -Sept. 67 Grundschule Neuenbürg

Sept. 67 -Juni 76 Reuchlin Gymnasium Pforzheim (Abitur)

Juli 76 -Sept. 77 Wehrdienst

Okt. 77 -März 80 Studium der Elektrotechnik an der
TU Karlsruhe (Vordiplom)

Nov. 80 -Juni 86 Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen
Hochschule Hannover (Staatsexamen)

Okt. 86 -Dez. 86 Praktikum am Institut für Tropenkrankheiten
und Parasitologie der LMU München

Jan. 87 Beginn der Promotionsarbeit an der Abteilung
für Molekulare Zellpathologie der Gesellschaft
für Strahlen- und Umweltforschung

